



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

A PROBLEMÁTICA DA REFRIGERAÇÃO DE SÉMEN EQUINO



Dissertação realizada por

Liliane Isabel Costa Damásio

Orientador: Doutora Elisa Maria Varela Bettencourt

Coorientador: Prof. Doutor António Luíz Mittermayer Madureira

Rodrigues da Rocha

2013
Évora



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

A PROBLEMÁTICA DA REFRIGERAÇÃO DE SÉMEN EQUINO

Dissertação realizada por

Liliane Isabel Costa Damásio

Orientador: Doutora Elisa Maria Varela Bettencourt

Coorientador: Prof. Doutor António Luíz Mittermayer Madureira
Rodrigues da Rocha

2013

Évora

"Todas as fotografias/imagens sem referência bibliográfica presentes nesta dissertação
são originais."

Dedicatória

Dedico a Ti Senhor, que estiveste sempre ao meu lado deixando as tuas pegadas junto das minhas. Dedico a Ti, porque sem a tua mão no meu ombro nunca teria conseguido. Obrigada por fazeres deste momento algo tão especial na minha vida!

Agradecimentos

Existem pessoas que fizeram parte dos meus últimos seis anos, marcando a diferença no meu percurso acadêmico, às quais não poderia deixar de agradecer tudo o que fizeram por mim. Tudo teria sido diferente se os momentos inesquecíveis que passei não tivessem a vossa presença! Por tudo isto, quero agradecer:

À **Doutora Elisa Bettencourt** por ter aceite ser minha orientadora de estágio, pelas inesquecíveis idas a Alter do Chão e pelo companheirismo e todos os conhecimentos que me transmitiu. Por ser a pessoa que é!

Ao **Professor Doutor António Rocha** por ter aceite ser meu coorientador, pela sua simpatia e simplicidade, pelo sorriso de todos os dias, pelos seus conselhos sábios e por acreditar sempre em mim. Obrigada por tudo o que me ensinou!

Ao **Dr. Tiago Pessanha Guimarães**, por tudo o que me ensinou nos meses de estágio, pelas dicas para matar moscas, pelos almoços de todos os dias, pelo pudim Abade de Priscos, pela boa disposição e até pela desarrumação. Obrigada por ter feito parte deste estágio.

À **Doutora Graça Lopes**, pela excelente pessoa que é, pela sabedoria que tão bem me soube transmitir e pela sua ajuda e exigência. Obrigada por acreditar em mim!

Aos meus **pais**, por estarem ao meu lado em todos os momentos, por aturarem os meus dias menos bons, por me abraçarem e por sorrirem comigo sempre que preciso. Obrigada pelo apoio incondicional.

À minha **irmã**, por ser a melhor do mundo e por estar sempre presente, pelas horas ao telefone, pelas vezes que aturou o meu mau humor e pelo companheirismo.

Aos meus **avós e restante família**, por todo o apoio e ajuda.

Ao **Mogli**, à **Daysinha**, ao **Kiko** e ao **Z D'Amour**, por me mostrarem o que existe para além de uma amizade.

À **Mané**, por ser um exemplo de esforço, pela amizade e por me fazer sentir especial em todos os momentos.

Ao **Jorge**, o meu grande amigo de sempre, por estar indefinidamente presente e me ajudar quando mais ninguém o sabe fazer.

Ao **Tiago Toscano**, por ser a pessoa especial que é, por todo o apoio e carinho.

Ao **Nuno**, por ter feito parte deste percurso e pelo grande apoio que me deu. Fizeste-me ver o quão forte sou e isso deu-me coragem para continuar sempre em frente.

À **Marta**, à **Joana**, à **Cátia** e à **Xixa**, por serem amigas que quero ter sempre perto, por tudo o que vivemos juntas, por todas as noites de divertimento e estudo. Vocês fazem parte do inesquecível.

À minha madrinha **Rute**, por me ter ajudado sempre que precisei e a qual tenho todo o orgulho de ter escolhido. Era impossível ter escolhido melhor!

A todos os **colegas de curso**, por todos os momentos que passámos juntos e por ocuparem um lugar muito especial na minha vida, especialmente ao **Rúben**, à **Catarina** e à **Katalin**.

Ao **Francisco**, pelo apoio e força especialmente nesta última fase, por ter sido sempre um colega de curso espetacular e por ser quem é hoje na minha vida!

E a **Ti** Senhor, por me teres ajudado a levar este desafio até ao fim e fazeres de mim aquilo que sou hoje.

Resumo

Um número significativo de garanhões produzem ejaculados de baixa qualidade e alta sensibilidade à refrigeração, necessitando de técnicas de processamento especializadas para otimizar a qualidade do sémen. Recentemente, foi disponibilizada uma técnica de centrifugação com monocamada (SLC) de Androcoll-E®, que tem demonstrado selecionar os espermatozoides (SPZ) de boa qualidade. No presente estudo pretendeu-se avaliar o efeito do tratamento com SLC na qualidade do sémen refrigerado, durante 72 horas. As amostras tratadas mostraram valores numéricos superiores para os parâmetros de motilidade, mas apenas se obtiveram valores estatisticamente significativos ($p<0,05$) para a velocidade curvilínea (VCL) e retilínea (VSL), medidas com um sistema computadorizado de análise de sémen, nas amostras tratadas. O reduzido número de amostras e a elevada variabilidade das características seminais entre ejaculados, podem ser responsáveis pela ausência de diferenças estatisticamente significativas, pelo que seria de interesse alargar este estudo a um maior número de garanhões para consolidar as conclusões.

Palavras-chave: garanhão; Androcoll-E®, SLC, refrigeração, sémen.

Abstract

THE PROBLEM OF COOLING OF EQUINE SPERM

A significant number of stallions produce ejaculates of low quality and high sensitivity to cooling, requiring specialized processing techniques to optimize the quality of sperm. Recently, a new protocol has been developed - the single layer centrifugation (SLC) with Androcoll-E®, which in some studies has been able to select good quality spermatozoa (SPZ). The objective of this study was to investigate the effect of SLC treatment on the quality of semen refrigerated for 72h. In our study, numerical improvements of motility parameters were seen in the treated samples, but only the curvilinear (VCL) and linear velocities (VSL) measured by a computer analysis system were significantly ($p < 0.05$) higher in the treated samples. Lack of significance may have been due to the small sample size and high variability among ejaculates. Expanding this data set with the use of further ejaculates from different stallions is warranted to draw more definitive conclusions.

Key-words: stallion, Androcoll-E®, SLC, cooling, sperm.

Índice Geral

Dedicatória	IV
Agradecimentos	V
Resumo.....	VII
Abstract	VIII
Índice Geral.....	IX
Índice de Gráficos	XII
Índice de Tabelas	XIII
Índice de Figuras	XIV
Índice de Siglas e Abreviaturas	XVII
I. Introdução geral	1
II. Revisão bibliográfica	4
2.1. Influência do ganhão na manutenção da viabilidade do sémen após refrigeração..	6
2.1.1. Variabilidade individual	7
2.1.2. Efeito do plasma seminal.....	8
2.1.3. Efeito da suplementação com antioxidantes e ácidos gordos polinsaturados na dieta do ganhão	10
2.2. Influência do protocolo de colheita de sémen na manutenção da sua viabilidade após refrigeração	11
2.3. Influência do processamento do sémen na manutenção da sua viabilidade após refrigeração	16

2.3.1.	Diluidores	17
2.3.2.	Centrifugação (lavagem de sémen)	21
2.3.3.	Refrigeração, armazenamento e transporte do sémen	24
2.4.	Utilização de técnicas de seleção de espermatozoides para aumentar a fertilidade do sémen refrigerado	28
2.4.1.	Migração (<i>Swim-up</i>)	32
2.4.2.	Filtração	32
2.4.3.	Centrifugação com coloide	33
III.	Trabalho experimental	39
3.1.	Introdução	39
3.2.	Material e métodos.....	40
3.2.1.	Garanhões e colheita de sémen.....	40
3.2.2.	Avaliação dos ejaculados frescos: volume, concentração, motilidade subjetiva e morfologia.....	41
3.2.3.	Processamento dos ejaculados.....	42
3.2.4.	Avaliação das amostras processadas às 0, 24, 48 e 72 horas.....	45
3.2.5.	Morfologia espermática às 72h	46
3.2.6.	Análise estatística.....	46
3.3.	Resultados.....	47
3.4.	Discussão e conclusão	50
IV.	Conclusões Gerais	53
	Bibliografia.....	55

Anexos	i
Anexo 1: Casuística geral das atividades desenvolvidas no CRAV do ICBAS-UP durante o estágio curricular	ii
Anexo 2: Protocolo para preparação de sémen equino utilizando Androcoll-E® -Large (CRAV, ICBAS-UP)	iv

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Valores numéricos referentes à casuística de clínica reprodutiva da égua (n=62 éguas; IA: inseminação artificial).	ii
Gráfico 2: Valores numéricos referentes à casuística de inseminação artificial (IA; n=56) e ecografias transretais (TR; n=532), diferenciando o número de procedimentos realizados e assistidos.	ii
Gráfico 3: Valores numéricos referentes à casuística de clínica reprodutiva do garanhão (n=13 garanhões).	iii
Gráfico 4: Valores numéricos referentes à casuística detalhada relativa à colheita de sémen no garanhão (n=44; VA: vagina artificial).	iii
Gráfico 5: Valores numéricos referentes à casuística detalhada relativa à manipulação de sémen (n=41; IA: inseminação artificial).	iii

Índice de Tabelas

Tabela 1: Propriedades dos diferentes métodos de separação e seleção de sémen (adaptado de Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009 e Len <i>et al.</i> , 2010).	31
Tabela 2: Comparação entre a técnica de centrifugação com monocamada de Androcoll-E® com a técnica de centrifugação por gradiente de densidade (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009).....	34
Tabela 3: Definições utilizadas no sistema de análise de sémen computadorizado (ISAS®).	46
Tabela 4: Valores médios $\pm\sigma$, mínimos, máximos e padrão (Crabtree, 2010) dos parâmetros analisados no sémen fresco imediatamente após colheita (n=9).....	47
Tabela 5: Valores médios $\pm\sigma$ das características cinéticas dos ejaculados às 0, 24, 48 e 72h para cada um dos processamentos de sémen realizados (n=9).....	48
Tabela 6: Valores percentuais das motilidades dos ejaculados de garanhões “maus refrigeradores” às 0, 24, 48 e 72h para cada um dos processamentos de sémen realizados (n=3).	49
Tabela 7: Valores percentuais médios $\pm\sigma^*$ de espermatozoides morfologicamente normais e de anomalias de cabeça, trato intermédio (TI) e cauda às 72h (n=8).....	50

Índice de Figuras

Fig. 1: Controlo folicular através de ecografia transretal em égua.	1
Fig. 2: Parques das éguas nas instalações do CRAV.....	3
Fig. 3: Colheita de sémen com vagina artificial (modelo Hannover), recorrendo a égua em cio.	4
Fig. 4: Diferentes formas de mensuração da concentração espermática. a) Hemocítmetro; b) Espectrofotómetro (SpermaCue®, Minitube; adaptado de Anónimo, 2011).	5
Fig. 5: Esfregaço de sémen corado com eosina-nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Espermatozoide morto corado a vermelho (seta; adaptado de Samper <i>et al.</i> , 2004).	6
Fig. 6: Opções para colheita de sémen com vagina artificial. a) Manequim de monta; b) Égua em cio com peias e assepsia da região perineal.	12
Fig. 7: Vaginas artificiais. a) Modelo Colorado; b) Modelo Missouri; c) Modelo Hannover (adaptado de Brinsko <i>et al.</i> , 2011c).....	12
Fig. 8: Estimulação sexual do garanhão por presença de égua em cio, exibindo reação de <i>flehmen</i> e ereção.	13
Fig. 9: Sémen contaminado em colheita de sémen com recurso a vagina artificial, devido a montas repetidas.....	14
Fig. 10: <i>Pellet</i> de espermatozoides (seta preta) obtido após centrifugação, com pequena percentagem de sobrenadante (seta branca) após o restante ter sido desprezado (fotografia cedida pelo Prof. Dr. António Rocha).	16
Fig. 11: Técnica de centrifugação com almofada (<i>cushion</i> ; adaptado de Loomis, s.d.) .	23
Fig. 12: Monta natural.....	24

Fig. 13: Condições de armazenamento de doses de sémen para inseminação artificial a 15 e a 4°C (adaptado de Batellier <i>et al.</i> , 2001).	26
Fig. 14: Embalagens para acondicionamento de sémen refrigerado durante o transporte. a) Seringa de plástico; b) Saco <i>Whirl-Pak</i> ®; c) Sacos de revestimento de biberão; d) Tubo de centrífuga (adaptado de Brinsko <i>et al.</i> , 2011c & Bedford-Guaus, 2007).	27
Fig. 15: Contentores comerciais para transporte de sémen refrigerado de garanhão. a) Equitaner®; b) Caixa de transporte de neopor (Minitube; fotografias cedidas pelo Prof. Dr. António Rocha).	28
Fig. 16: a) Superfície lateral do ovário, oviduto (infundíbulo, ampola, e istmo) e final do corno uterino, exposto através de laparotomia; b) Oviduto dissecado (adaptado de Brinsko <i>et al.</i> , 2011b).	29
Fig. 17: Inseminação artificial em égua.....	30
Fig. 18: Centrifugação por gradiente de densidade (CGD). O gradiente de densidade é composto pelo menos por duas camadas de coloides de densidades diferentes, sendo o sémen diluído depositado sobre a parte superior da camada de coloide de menor densidade. Após centrifugação, forma-se um <i>pellet</i> de espermatozoides no fundo do tubo, enquanto o sobrenadante é constituído por plasma seminal e diluidor de sémen.	35
Fig. 19: Centrifugação com monocamada (SLC) de coloide Androcoll-E®. O sémen diluído é depositado sobre a parte superior da monocamada de coloide Androcoll-E® e após centrifugação forma-se um <i>pellet</i> de espermatozoides no fundo do tubo, enquanto o sobrenadante é constituído por plasma seminal, diluidor de sémen e coloide (fotografia cedida pelo Prof. Dr. António Rocha).	38
Fig. 20: Enchimento da vagina artificial com água quente, para obtenção de temperatura interna de 45-50°C.	40

Fig. 21: Filtração do sémen. a) Filtro de <i>nylon</i> ; b) Filtração através de compressas, a partir do recipiente de colheita para um recipiente pré-aquecido a 37°C (adaptado de Anónimo, s.d.).....	41
Fig. 22: Medição do volume de sémen filtrado através da escala incorporada no recipiente de colheita de sémen (adaptado de Crabtree, 2010).	42
Fig. 23: Representação esquemática do processamento dos ejaculados, utilizando a diluição controlo para refrigeração (esquerda) e a centrifugação com monocamada de Androcoll-E® (direita; SPZ: espermatozoides; adaptado de Hoogewijs <i>et al.</i> , 2011).....	43
Fig. 24: Amostras de sémen de menor volume armazenadas em tubos <i>Falcon</i> de 15 mL, envolvidos por uma proteção isolante no copo isotérmico do Equitaner® (fotografia cedida pelo Prof. Dr. António Rocha).	44
Fig. 25: Câmara de contagem de 16 micra de profundidade (ISAS®).	45
Fig. 26: Primeiro poldro nascido no CRAV após IA de égua com 22 anos e útero de grau III, através da utilização de sémen refrigerado no qual foi aplicada a técnica de centrifugação com monocamada de Androcoll-E® (24 de maio de 2012).	53

Índice de Siglas e Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

PSI – Puro sangue inglês

C- Controlo

PSL – Puro sangue lusitano

CGD - Centrifugação por gradiente de densidade

PVP - Polivinilpirrolidona

CRAV - Centro de Reprodução Animal De Vairão

Ráp - Células rápidas

HEPES - 2-hidroxi-etil-1-piperazina-etano-sulfónico

ROS - Espécies reativas ao oxigénio (*reactive oxygen species*)

IA - Inseminação artificial

SLC – Centrifugação com monocamada (*single layer centrifugation*)

ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

SPZ - Espermatozoides

IO - Índice de oscilação

TI - Trato intermédio

MP - Motilidade progressiva

VA - Vagina artificial

MSub - Motilidade subjetiva

VAP - Velocidade média

MT - Motilidade total

VCL - Velocidade curvilínea

PMN - Neutrófilos polimorfonucleares (*polymorphonuclear neutrophil*)

VSL - Velocidade retilínea

PS - Plasma seminal

σ – Desvio padrão

I. Introdução geral

A reprodução assistida em equinos engloba uma vasta panóplia de técnicas, sendo a inseminação artificial (IA) com sémen refrigerado, sem dúvida, a mais disseminada na Europa. A refrigeração de sémen é um método comumente utilizado e aceite para preservação a curto prazo, permitindo a IA de éguas em localizações distantes (Aurich & Aurich, 2006; Love *et al.*, 2011).

Também em Portugal esta indústria parece estar em crescimento, sendo a IA com sémen refrigerado a técnica que parece estar a despertar maior interesse por parte dos criadores. Há já alguns grupos de médicos veterinários que contabilizaram a execução de um número superior a 200 inseminações por ano, e um colega ligado à Fundação Alter Real que referiu um número superior a 600, numa época reprodutiva.

Estas e várias outras equipas utilizam esta técnica em todo o país, envolvendo a utilização de garanhões nacionais, o que tem vindo a desenvolver a aplicação de outras atividades técnicas como o controlo folicular (Fig. 1), a colheita, a avaliação, a refrigeração e até a congelação de sémen (Rocha, 2011, comunicação pessoal).



Fig. 1: Controlo folicular através de ecografia transretal em égua.

Contudo, a crescente utilização da técnica de IA usando sémen refrigerado, tem sido acompanhada pela diminuição da taxa de fertilidade. De facto, a probabilidade de gestação após inseminação com sémen refrigerado, por um período de 24 horas, é 2,5 vezes inferior à associada à inseminação com sémen fresco (Aurich, 2008; Love *et al.*, 2011). Tendo em conta que, aquando da colheita de sémen, processamento e posterior IA existem riscos elevados de agressão externa aos espermatozoides (SPZ),

torna-se imperativa a correta aplicação das técnicas de preparação e utilização deste tipo de sémen na indústria equina, de modo a permitir a maximização das taxas de gestação (Loomis, 2006; Bradecamp, 2011).

Existe uma percentagem significativa de garanhões que consistentemente produzem ejaculados de baixa qualidade e alta sensibilidade à refrigeração. O conhecimento e compreensão dos fatores envolvidos nesta problemática, tendo em conta não só os associados ao garanhão como também os inerentes à técnica de colheita e processamento, em conjunto com a utilização de técnicas de seleção de espermatozoides, permitem otimizar a qualidade do sémen após refrigeração, com o objetivo final de aumentar a taxa de fertilidade (Aurich, 2008; Bradecamp, 2011; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011; Costa *et al.*, 2012).

Com a presente dissertação procurou-se consolidar os conhecimentos teóricos e práticos obtidos ao longo do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, no que concerne ao processamento e refrigeração de sémen equino, através da realização de uma revisão bibliográfica centrada nos principais problemas encontrados na aplicação prática desta técnica na espécie em questão. Com vista à seleção de subpopulações espermáticas de melhor qualidade para refrigeração, realizou-se um trabalho experimental utilizando uma técnica recentemente disponibilizada, que consiste na seleção de espermatozoides através de uma centrifugação com monocamada (SLC) com um coloide de sílica específico para equinos (Androcoll-E®). Após este procedimento, foram analisadas as alterações na qualidade do sémen (motilidade e morfologia espermáticas) após a refrigeração e armazenamento das amostras durante 72h, com o objetivo final de avaliar a aplicabilidade desta técnica na indústria da reprodução equina.

Este trabalho tem a sua base no estágio curricular realizado na área da Reprodução Equina, no Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV; Fig. 2), do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), com a coorientação do Professor Doutor António Rocha e a orientação da Doutora Elisa Bettencourt. Este estágio abrangeu o período da época reprodutiva de 1 de abril a 31

de julho de 2012, sendo a equipa do CRAV constituída pelo Professor Doutor António Rocha e pelo Dr. Tiago Guimarães. Durante este período foram acompanhadas todas as atividades realizadas no CRAV, assim como as de clínica ambulatória (Anexo 1), possibilitando a aquisição de competências práticas e autonomia na área de clínica reprodutiva equina.



Fig. 2: Parques das éguas nas instalações do CRAV.

II. Revisão bibliográfica

A problemática da refrigeração de sémen equino

A obtenção de uma amostra de sémen de alta qualidade após a sua colheita e processamento é um aspeto crítico no sucesso da técnica de preservação de sémen equino para IA (Loomis, 2011a).

A colheita de sémen é o primeiro passo do processo de refrigeração de sémen, sendo a colheita com vagina artificial (VA) a técnica mais comumente utilizada (Fig. 3). Para otimizar a qualidade do sémen é importante ter em conta o protocolo de colheita utilizado, objetivando a obtenção de um ejaculado à primeira tentativa, o que por sua vez minimiza a contaminação do mesmo e a quantidade de plasma seminal (PS). Para separar a fração gelatinosa do restante ejaculado e remover os detritos, pode recorrer-se a um filtro, não tóxico, que pode ser incorporado diretamente nos recipientes durante a colheita de sémen com VA (filtro de malha de *nylon*; Fig. 21a), ou pode realizar-se após a mesma,



Fig. 3: Colheita de sémen com vagina artificial (modelo Hannover), recorrendo a égua em cio.

utilizando os referidos filtros, compressas (Fig. 21b) ou filtros para leite. Todos os procedimentos efetuados posteriormente à colheita devem ser realizados com a precaução de evitar o choque térmico, devendo o equipamento que entra em contacto com o sémen estar aquecido a uma temperatura de 37-38°C (Aurich, 2008; Brinsko, 2011; Brinsko *et al.*, 2011c).

Imediatamente após a colheita, devem ser analisadas as características macro e microscópicas do sémen. O volume do ejaculado filtrado é medido através de uma

escala, que geralmente está incorporada no recipiente de colheita (Fig. 22), a cor deve ser entre branco-acinzentado e branco-leitoso, a densidade varia de aquosa a leitosa consoante a concentração espermática e o odor deve ser *sui-generis*. A motilidade espermática é avaliada colocando uma gota de sémen entre uma lâmina e uma lamela aquecidas a 37°C e visualizando-se em microscópio ótico, de preferência com platina aquecida à mesma temperatura, e ampliação de 200x. Este procedimento permite estimar a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e a velocidade dos espermatozoides, devendo ser realizada o mais rapidamente possível após a colheita, pois estes parâmetros deterioram-se com o tempo e com a diminuição da temperatura (Crabtree, 2010; Brinsko *et al.*, 2011c; Loomis, 2011a).

A mensuração da concentração pode ser realizada recorrendo a um hemocitômetro (Fig. 4a) ou a um espectrofotômetro (Fig. 4b). Deve ser também avaliada a morfologia espermática, pela realização de um esfregaço de sémen corado com eosina-nigrosina e visualização com

microscopia
ótica, ou fixado
com formol
salino
tamponado a
10% e
visualização com
microscopia de

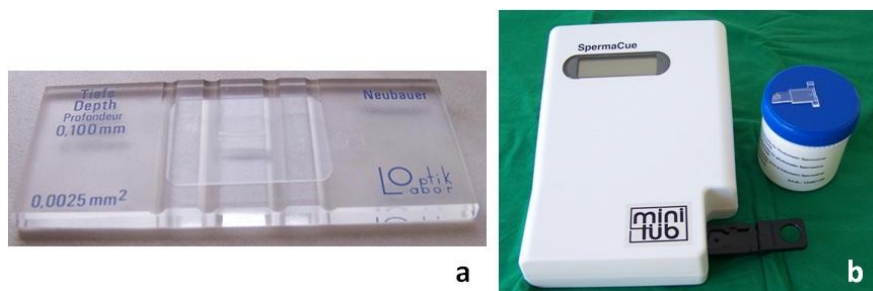


Fig. 4: Diferentes formas de mensuração da concentração espermática. a) Hemocitômetro; b) Espectrofotômetro (SpermaCue®, Minitube; adaptado de Anónimo, 2011).

contraste de fase (Samper *et al.*, 2004). Pode também ser avaliada a integridade da membrana plasmática pela realização de um esfregaço com coloração de eosina-nigrosina (Fig. 5) ou com corantes específicos e uso de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. A avaliação morfológica deve ser realizada pela observação de pelo menos 100 células em microscopia ótica, com ampliação de 1000x e recurso a óleo de imersão (Graham, 2001; Samper *et al.*, 2004; Crabtree, 2010; Brinsko *et al.*, 2011a; Loomis, 2011a).

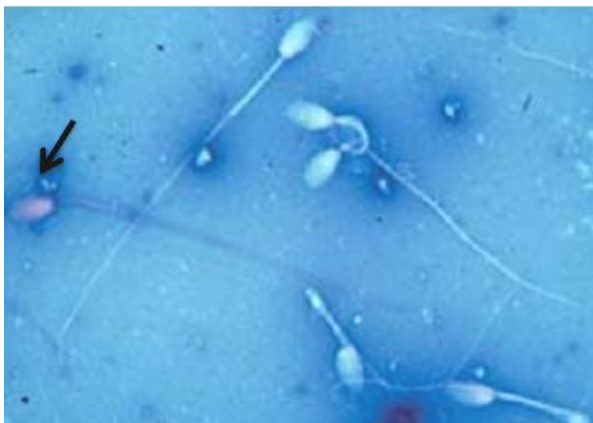


Fig. 5: Esfregaço de sémen corado com eosina-nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Espermatozoide morto corado a vermelho (seta; adaptado de Samper *et al.*, 2004).

A diluição aconselhada para a refrigeração e armazenamento de sémen varia entre 1:3 (sémen:diluidor) e 1:10, como reportado na literatura, de modo a permitir a obtenção de uma concentração final de 25 a 50 milhões de SPZ por mililitro, estando esta diluição associada à maximização da motilidade e longevidade *in vitro*. A dose inseminante pretendida, e que tem sido associada a uma boa taxa de fertilidade, é de 500 milhões de SPZ com motilidade progressiva (Sheerin,

2007; Bradecamp, 2011; Brinsko, 2011; Brinsko *et al.*, 2011d; Loomis, 2011a).

A refrigeração e armazenamento do sémen podem ser realizados em seringas de material não espermicida, sacos ou tubos de centrifuga devidamente identificados, colocados num Equitaner® ou em caixa térmica apropriada (Brinsko *et al.*, 2011d).

Existem numerosos fatores que influenciam o sucesso da refrigeração de sémen, sendo estes fatores inerentes ao próprio garanhão, o protocolo de colheita, o processamento do sémen e mesmo a experiência e competência prática do operador (Loomis, 2011a).

2.1. Influência do garanhão na manutenção da viabilidade do sémen após refrigeração

O conhecimento cada vez mais aprofundado da tecnologia de refrigeração de sémen equino tem possibilitado a redução dos problemas relacionados com a qualidade do mesmo após armazenamento. Com o objetivo de avaliar o impacto individual na

resistência do sémen à refrigeração, têm sido realizados numerosos estudos, pois por si só, o garanhão influencia significativamente a qualidade e fertilidade do sémen refrigerado e armazenado. Dentro dos vários parâmetros analisados, destacam-se a variabilidade individual, o efeito do plasma seminal e da suplementação da dieta com antioxidantes e ácidos gordos polinsaturados (Aurich, 2008).

2.1.1. Variabilidade individual

As características individuais têm um efeito crucial na longevidade do sémen equino, existindo alguns garanhões para os quais a IA após refrigeração é inviabilizada pela extrema sensibilidade do seu sémen a este processo. Desta forma, perde-se um dos principais benefícios da IA, ou seja, a utilização de sémen de diferentes garanhões após refrigeração em diferentes localizações, apenas se tornando possível realizar esta técnica de reprodução assistida com sémen fresco (Brinsko *et al.*, 2000a; Aurich, 2008). Numa revisão realizada por Aurich (2005), salienta-se que a resistência à refrigeração e armazenamento não depende apenas da qualidade do sémen puro, mas também da composição do PS e da integridade das membranas plasmáticas dos SPZ.

Assim, Brinsko *et al.* (2000a) agruparam os garanhões em dois grupos distintos, em função da manutenção da motilidade seminal após processamento, refrigeração e armazenamento. Consideraram como “maus refrigeradores” os garanhões cujo sémen produzido apresenta uma quebra superior ou igual a 40% da MP após 24h de refrigeração, enquanto os “bons refrigeradores” têm uma redução menor ou igual a 30% da MP nas mesmas condições.

Os critérios de seleção genética utilizados no garanhão são primariamente baseados no *pedigree*, características fenotípicas e *performance* desportiva, e não na qualidade do sémen, sendo este um dos motivos pelo qual a fertilidade nesta espécie tem, em geral, valores baixos e variáveis (Neild *et al.*, 2005; Aurich, 2008). Assim, é importante ter em conta que a fertilidade do garanhão é uma característica que deve ser valorizada, pois apresenta uma base ambiental e genética complexa, variando a

estimativa da sua heritabilidade entre 0,03 e 0,15 para a taxa de nascimentos por estação de monta (Dohms, 2002 & Hamann *et al.*, 2005a citados por Giesecke *et al.*, 2010).

2.1.2. Efeito do plasma seminal

O plasma seminal consiste num fluido produzido pelos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, que funciona como um suporte para os SPZ se deslocarem do trato genital do macho até ao útero da égua (Kareskoski & Katila, 2008; Katila *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2013). O ejaculado do garanhão é composto por uma série de cinco a dez jatos de sémen consecutivos, que diferem quer na concentração em SPZ, quer no volume e na composição do PS (Kosiniak, 1975 citado por Kareskoski & Katila, 2008; McDonnell, 1992; Tibary, 2007). O PS está envolvido no transporte e suprimento de substratos metabólicos aos SPZ, participa no processo de maturação dos mesmos e contém substâncias que protegem e estimulam estas células (Troedsson *et al.*, 2001). Contudo, o PS possui tanto efeitos benéficos como prejudiciais para a qualidade do sémen, não representando por isso um meio ideal para a refrigeração e armazenamento do mesmo (Pickett *et al.*, 1975 citado por Brinsko *et al.*, 2000a; Jasko *et al.*, 1992).

Um dos efeitos benéficos do PS está relacionado com as suas propriedades antioxidantes, que previnem a formação de espécies reativas ao oxigénio (ROS), sendo este efeito potencializado pela interação com o diluidor de sémen (Kankofer *et al.*, 2005). Além deste efeito positivo, acredita-se também que o PS desempenha um papel importante na modulação da resposta imunológica e fisiológica no trato reprodutivo da égua, após beneficiação ou IA, estando relacionado com o transporte e eliminação de contaminantes e SPZ mortos ou que apresentem anomalias morfológicas, enquanto as suas proteínas protegem seletivamente os SPZ vivos da fagocitose por neutrófilos polimorfonucleares (PMN; Jasko *et al.*, 1991; Troedsson, 1999).

O PS contém propriedades que afetam a capacitação espermática e a reação do acrossoma não só dentro do trato genital da fêmea, como também durante o armazenamento e transporte do sémen refrigerado, pelo que a remoção total das suas proteínas durante o processamento do sémen pode alterar a estabilidade da membrana plasmática e pré-capacitar os espermatozoides, encurtando assim o seu tempo de vida funcional (Brandon *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2008).

Por outro lado, a manutenção de altas concentrações de PS no sémen a ser refrigerado, tem sido considerada deletéria para a manutenção da motilidade e da fertilidade dos SPZ (Pickett *et al.*, 1975 citado por Brinsko *et al.*, 2000a; Jasko *et al.*, 1992). Em condições de monta natural, o sémen é ejaculado diretamente no lúmen uterino da égua em cio, estando os espermatozoides expostos a um ambiente otimizado até à fertilização no oviduto, e sendo o tempo de contacto destas células com altas concentrações de fluido seminal inferior ao que os SPZ são submetidos quando colhidos com VA (Loomis, 2006).

É atualmente aceite que a presença de uma pequena percentagem de PS é necessária para otimizar e prolongar a qualidade dos espermatozoides durante o armazenamento do sémen refrigerado. A remoção parcial do PS através de técnicas de centrifugação é especialmente importante em ejaculados de garanhões classificados como “maus refrigeradores” e com baixa concentração espermática (Brinsko *et al.*, 2000a; Bradecamp, 2011). Desta forma, a maioria dos protocolos utilizados recomendam a retenção de 5 a 20% de PS após centrifugação, sendo uma concentração de 5 a 10% considerada como ótima para refrigeração por períodos superiores a 24-48h (Todd *et al.* 2001 citado por Katila *et al.*, 2010; Loomis, 2006; Bradecamp, 2011). A concentração final de SPZ aconselhada para a refrigeração do sémen equino é, como anteriormente referido, de 25 a 50 milhões de SPZ por mililitro de diluidor à base de leite, valores que tendem a maximizar a sua capacidade de sobrevivência *in vitro* (Brinsko *et al.*, 2011d).

Carver & Ball (2002) referem que os efeitos deletérios do PS nos SPZ durante a refrigeração e armazenamento podem também estar relacionados com a ação de enzimas específicas, como a lipase, que podem prejudicar a motilidade seminal.

2.1.3. Efeito da suplementação com antioxidantes e ácidos gordos polinsaturados na dieta do garanhão

Os espermatozoides, por serem células que vivem em condições aeróbias, produzem ROS como resultado do seu metabolismo normal. Por este motivo, e devido ao elevado conteúdo das suas membranas plasmáticas em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, os SPZ são particularmente suscetíveis à peroxidação lipídica por ROS (Jones & Mann, 1973; de Lamirande *et al.*, 1997; Deichsel *et al.*, 2008). Em condições normais, a maioria dos ROS são continuamente neutralizados por catalisadores enzimáticos de baixo peso molecular contidos nos SPZ e PS, mas um desequilíbrio na produção ou na degradação de ROS pode ter efeitos adversos graves sobre a função espermática, nomeadamente na motilidade, que diminui antes de ocorrerem alterações detetáveis na integridade da membrana (de Lamirande *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2002).

Existem vários mecanismos fisiológicos que contrariam os efeitos deletérios de uma produção exagerada de ROS, nomeadamente a ação de antioxidantes (ácido ascórbico, glutathione redutase, ácido úrico, vitamina E e β -caroteno) e de enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione transferase e glutathione peroxidase; Cotgreave *et al.*, 1988 citado por Deichsel *et al.*, 2008). A suplementação da dieta com antioxidantes, tais como o ácido ascórbico, tocoferol, selénio, ou certas enzimas, tem sido associada ao incremento dos mecanismos de defesa antioxidantes dos SPZ, através da prevenção de lesões celulares que se julga serem associadas à presença de radicais livres presentes nas várias fases da espermatogénese, no ejaculado e nos meios de manipulação de sémen (Aurich, 2008).

Têm sido realizados alguns trabalhos de investigação com o objetivo de obter uma melhoria na qualidade do sémen através da suplementação alimentar dos garanhões.

Deichsel *et al.* (2008) demonstraram não existirem melhorias significativas na qualidade e longevidade do sémen produzido por garanhões pónei alimentados com uma ração suplementada com tocoferol, ácido ascórbico, L-carnitina e ácido fólico (STALLION®, Pavo Pferdenahrung, Goch, Alemanha), após 24h de refrigeração. Brinsko *et al.* (2005) realizaram um estudo com oito garanhões, suplementando a dieta destes animais com ácido docosahexaenoico (ácido gordo polinsaturado) através de uma ração comercial neutracêutica para varrascos (ProSperm®, Minitube of America, Verona, WI, USA). Nos resultados obtidos também não se verificaram alterações na motilidade espermática do sémen fresco, mas os parâmetros de motilidade avaliados mostraram uma melhoria no sémen refrigerado, após um período de 48h, sendo esta melhoria ainda mais evidente em cavalos “maus refrigeradores”, após 24h de refrigeração. Num estudo mais recente efetuado por Contri *et al.* (2011), verificou-se que a suplementação da dieta com selénio orgânico, vitamina E e zinco leva à melhoria da motilidade do sémen fresco, devido ao aumento do poder antioxidante do plasma seminal e tendo também um efeito nos SPZ durante a espermatogénese e maturação no epidídimo.

Assim, a alteração da qualidade da membrana plasmática dos espermatozoides e dos mecanismos de defesa antioxidantes, através da suplementação alimentar, parece ser uma opção interessante, no entanto, são necessários mais estudos que permitam confirmar a utilidade destes produtos na otimização da *performance* reprodutiva do garanhão com uma base científica mais sólida (Aurich, 2008).

2.2. Influência do protocolo de colheita de sémen na manutenção da sua viabilidade após refrigeração

A colheita de sémen é um procedimento essencial nos programas de IA em equinos, sendo necessário otimizar o protocolo utilizado para evitar uma quebra na qualidade do sémen por alterações de origem iatrogénica. A utilização de VA (Fig. 3) é o método mais frequentemente utilizado, seja usando uma égua em cio como monta (Fig. 6b) ou

o manequim (Fig. 6a). Existem também outras técnicas que podem ser utilizadas para colheita de sêmen, tais como a colheita com preservativo colocado no pênis do garanhão, a ejaculação farmacologicamente induzida, a estimulação manual e a colheita de sêmen do epidídimo (Sheerin, 2007; Aurich, 2008; Brinsko, 2011).



Fig. 6: Opções para colheita de sêmen com vagina artificial. a) Manequim de monta; b) Égua em cio com peias e assepsia da região perineal.



Fig. 7: Vaginas artificiais. a) Modelo Colorado; b) Modelo Missouri; c) Modelo Hannover (adaptado de Brinsko *et al.*, 2011c).

Existe uma variedade de modelos de VA, estando entre os mais utilizados os modelos Colorado (Fig. 7a), Missouri (Fig. 7b) e Hannover (Fig. 7c), variando estes essencialmente no custo, revestimento, durabilidade, peso, capacidade de manutenção da temperatura e perdas de sêmen durante a colheita. A seleção do modelo a utilizar baseia-se nas necessidades específicas do garanhão e na preferência do técnico (Sheerin, 2007; Brinsko *et al.*, 2011c). O modelo Missouri é um dos mais utilizados, não só por ser dos mais económicos, mas também por ser leve, bastante flexível e fácil

de montar e limpar. A sua principal desvantagem é a perda rápida de temperatura. A VA Colorado, apesar de manter bem a temperatura, necessita de cerca de oito litros de água quente, pelo que a sua utilização é limitada pelo seu peso excessivo. Além disto, o sémen fica sujeito à temperatura da VA, podendo mais facilmente ocorrer danos nos SPZ pelo calor. O modelo Hannover consiste numa VA leve e rígida, a qual possui um “fornix” e uma válvula de saída de água, que permite ajustar a pressão ao pénis durante a colheita (Shepherd, 2008; Brinsko *et al.*, 2011c).

Para a obtenção de uma eficiência reprodutiva máxima, objetivando uma colheita de sémen de alta qualidade, o manejo do garanhão deve ser gerido com vista à manutenção do comportamento sexual normal e de uma boa líbido, utilizando métodos, intervalos e frequências de colheita apropriadas (Pickett *et al.*, 1975 citado por Sieme *et al.*, 2004).

O protocolo de colheita de sémen utilizado parece ser um dos pontos-chave na melhoria da qualidade do sémen refrigerado. A sua otimização deve ter em conta as características individuais de cada garanhão, com vista à obtenção de um ejaculado com baixo volume seminal e alta concentração espermática (Loomis, 2006; Aurich, 2008).

O volume do ejaculado (mas não o número total de SPZ) é influenciado pela estimulação sexual do garanhão antes da ejaculação (Fig. 8). Segundo Sieme *et al.* (2004), o aumento do número de montas necessárias à obtenção de um ejaculado, propicia o incremento da secreção de plasma seminal, e consequentemente a concentração e a longevidade dos SPZ diminuem. Simultaneamente, e pelo mesmo motivo, a integridade da



Fig. 8: Estimulação sexual do garanhão por presença de égua em cio, exibindo reação de *flehmen* e ereção.

membrana dos espermatozoides no sémen fresco, bem como a MP no sémen refrigerado a 5°C durante 24h, são afetadas negativamente (Sieme *et al.*, 2004). A libido, o ambiente envolvente e a prática do operador são parâmetros que influenciam grandemente o número de montas e o tempo necessário para a colheita de um ejaculado. Assim, é essencial o treino do operador e do garanhão, pois a inexperiência dos mesmos, um ambiente envolvente inadequado e equipamentos impróprios são os piores pré-requisitos para a colheita de sémen destinado à refrigeração (Aurich, 2008).

Outro motivo pelo qual devem ser evitadas as montas repetidas é o aumento da



Fig. 9: Sémen contaminado em colheita de sémen com recurso a vagina artificial, devido a montas repetidas.

probabilidade de contaminação bacteriana do ejaculado colhido, através da superfície genital do garanhão ou do ambiente. Isto ocorre especialmente quando é utilizada a mesma VA nas diferentes montas, e não se procede à substituição do recipiente de colheita ou da bacia sanitária, levando ao aumento da fração pré-espermática e de contaminantes (detritos e lubrificante hidrossolúvel) no sémen colhido (Fig. 9). A contaminação do sémen com pequenas quantidades de lubrificante hidrossolúvel aumenta significativamente a osmolaridade e diminui o pH do sémen, reduzindo

por consequência a sua qualidade. Desta forma, grandes quantidades de lubrificante devem ser evitadas e, no caso de montas repetidas, o reservatório de colheita deve ser substituído entre montas (Duoos *et al.*, 2002; Limone *et al.*, 2002; Loomis, 2006).

Está descrita uma técnica, que permite diminuir o volume seminal durante a colheita e, consequentemente, aumentar a concentração espermática. Isto é possível quando, após o início da monta, o pénis do garanhão é desviado da vagina artificial durante alguns segundos, enquanto a fração pré-espermática (secreções das glândulas bulbouretrais) é emitida (Loomis, 2006).

Têm sido realizados alguns estudos que indicam que a frequência de ejaculação influencia a qualidade do sémen, mas, devido à inconsistência nos resultados obtidos, ainda não foi descrito um protocolo ideal que defina a frequência ótima entre colheitas de sémen em garanhões, em programas de IA (Sieme *et al.*, 2004). Pickett *et al.* (1975) recomendavam uma colheita em dias alternados, enquanto Sieme *et al.* (2002) indicavam colheitas simples diárias. Em contrapartida, Magistrini *et al.* (1987) reportaram que a motilidade do sémen não foi afetada significativamente pela frequência de colheita. Sieme *et al.* (2004) demonstraram que o primeiro ejaculado de colheitas de sémen duplas com uma hora de intervalo a cada 48h apresentava valores significativamente superiores de concentração e percentagem de MP às 24h de refrigeração a 5°C, quando comparado com ejaculados obtidos por colheitas simples diárias. O segundo ejaculado destas colheitas duplas apresentava valores significativamente inferiores de volume, concentração e percentagens de MT e MP às 24h de refrigeração a 5°C quando comparado com o primeiro ejaculado das colheitas duplas. Desta forma, este autor constatou que o primeiro ejaculado das colheitas duplas mostra melhor qualidade do sémen fresco e refrigerado, relativamente às colheitas simples diárias.

Apesar destas recomendações, é prática corrente a realização de colheitas diárias em garanhões que beneficiam um grande número de éguas (Sieme *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado também que se a frequência e o tempo de intervalo entre ejaculações forem razoavelmente constantes, durante os programas de colheita, os seus efeitos são praticamente nulos sobre a produção e qualidade do sémen, estimada pela avaliação da motilidade inicial (Squires *et al.*, 1979 citado por Sieme *et al.*, 2004).

Desta forma, conclui-se que o mais importante é uma boa compreensão da fertilidade potencial e das limitações de cada garanhão, sendo a frequência ótima de colheita de sémen, durante a época de reprodução, a que permitir manter uma boa libido e, em simultâneo uma boa qualidade do sémen (Sieme *et al.*, 2004; Allen & Wilsher, 2012).

2.3. Influência do processamento do sémen na manutenção da sua viabilidade após refrigeração

Inicialmente, e como já referido, são avaliadas as características macroscópicas e microscópicas do ejaculado, entre as quais se destacam o volume filtrado, a concentração e a motilidade dos SPZ.

Bradecamp (2011) classificou os ejaculados em baixa e alta qualidade, consoante a sua concentração inicial fosse, respetivamente, inferior ou superior a 100×10^6 SPZ/mL. A diluição do sémen para refrigeração e armazenamento deve ser no mínimo 1:3 (sémen:diluidor), o que reduz o PS para uma quantidade inferior ou igual a 25% e possibilita a obtenção de uma concentração final ideal para equinos ($25\text{--}50 \times 10^6$ SPZ/mL; Sheerin, 2007; Bradecamp, 2011; Brinsko *et al.*, 2011d; Loomis, 2011a).

Existem alguns ejaculados, que por apresentarem concentrações inferiores a 100×10^6 SPZ/mL, não permitem realizar uma diluição com uma taxa mínima de 1:3 e manter uma concentração final adequada. Estes ejaculados devem ser submetidos a uma centrifugação, de forma a baixar a quantidade de PS e, consequentemente, a sua sensibilidade à refrigeração. Esta técnica consiste sucintamente na centrifugação do sémen diluído imediatamente após a colheita, e posterior remoção do sobrenadante (que consiste essencialmente em plasma seminal e diluidor).

O *pellet* resultante desta centrifugação (Fig. 10) é constituído não só por espermatozoides viáveis, como também por espermatozoides mortos e células anormais, que são em seguida ressuspensos num volume adequado de novo diluidor. Os ejaculados de alta qualidade não necessitam de nenhum processamento especial, sendo apenas realizada a diluição do



Fig. 10: *Pellet* de espermatozoides (seta preta) obtido após centrifugação, com pequena percentagem de sobrenadante (seta branca) após o restante ter sido desprezado (fotografia cedida pelo Prof. Dr. António Rocha).

sémen (Hallap *et al.*, 2004; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009; Bradecamp, 2011).

O próximo passo consiste em escolher o diluidor mais adequado para o garanhão em questão. Para isso, podem ser realizados testes com diferentes tipos de diluidores (Bradecamp, 2011).

Em seguida procede-se à refrigeração e armazenamento do sémen, que pode ser realizada em seringas, sacos ou tubos de centrífuga cónicos, de material não espermicida. O sémen é depois colocado num contentor adequado, que permite um arrefecimento controlado e manutenção da temperatura de refrigeração do sémen durante um período de tempo determinado (Sheerin, 2007).

2.3.1. Diluidores

Os diluidores de sémen desempenham um papel fundamental na manutenção da viabilidade e longevidade dos espermatozoides fora do trato reprodutivo, durante o armazenamento do sémen refrigerado, que dura em geral 24 a 48h. A sua composição permite o aumento da sobrevivência dos SPZ durante o intervalo entre a colheita e a IA, através do controlo do pH e da osmolaridade do sémen, bem como pelo fornecimento de substratos metabolizáveis, inibição ou eliminação do crescimento bacteriano e proteção dos SPZ contra o choque térmico (Aurich, 2005; Aurich, 2011, Brinsko, 2011; Brinsko *et al.*, 2011d).

A osmolaridade normal do sémen de garanhão é cerca de 300 mOsm/L, mas os diluidores utilizados podem possuir valores entre 250 e 400 mOsm/L sem deteriorar a qualidade do sémen. Tem sido constatado que uma leve hiperosmolaridade pode ser benéfica, sendo considerada a osmolaridade ótima dos diluidores aproximadamente 350 mOsm/L (Aurich, 2011).

A contaminação bacteriana do sémen, tal como a produção de substâncias metabólicas pelos SPZ, podem causar desvios no pH do sémen processado. Para controlar estes efeitos, são adicionadas substâncias tampão aos diluidores, tais como

bicarbonato de sódio, citrato de sódio e 2-hidroxi-etil-1-piperazina-etano-sulfônico (HEPES). A eficiência destas substâncias depende do pH do meio ambiente, e cada substância tampão possui um intervalo ótimo de pH para que seja efetiva. Os produtos lácteos, presentes nos diluidores, também providenciam alguma capacidade tampão (Aurich, 2011). Os valores considerados fisiológicos para o ejaculado de garanhão variam consoante os autores. Aurich (2011) considera que o pH normal se situa no intervalo 6,8 a 7, enquanto Crabtree (2010) refere valores entre 7,2 e 7,7. Segundo Brinsko (2011), os diluidores de sémen devem permitir manter o pH do mesmo entre 6,7 e 7,2, contudo, Brinsko *et al.* (2011d) consideram que o pH ótimo varia entre 6,7 e 6,9, correspondendo estes valores ao intervalo no qual são otimizados os movimentos lineares dos SPZ.

Existe uma vasta diversidade de diluidores que combinam vários componentes (açúcares, eletrólitos, soluções tampão, gema de ovo, leite e produtos lácteos), podendo estes componentes corresponder a formulações disponíveis comercialmente ou de fabrico “caseiro”. Ainda não está totalmente esclarecida a natureza dos efeitos benéficos dos diferentes componentes dos diluidores na manutenção da viabilidade dos espermatozoides, mas sabe-se que as lipoproteínas, como as que existem no leite e na gema de ovo, protegem o sémen contra o choque osmótico pela estabilização das membranas celulares, enquanto os substratos metabolizáveis, como a glucose, providenciam uma fonte energética aos espermatozoides (Batellier *et al.*, 2001; Brinsko *et al.*, 2011d).

Um dos principais problemas dos diluidores de sémen à base de leite ou de gema de ovo, está relacionado com a complexidade destas substâncias biológicas, podendo as moléculas que os compõem variar entre lotes. Assim, os diferentes componentes dos diluidores podem ter, além dos efeitos benéficos sobre as membranas plasmáticas, alguns efeitos prejudiciais (Aurich, 2005).

Os diluidores mais frequentemente utilizados para diluição, centrifugação e refrigeração de sémen têm na sua base leite desnatado em pó e glucose, com composição semelhante à fórmula publicada originalmente por Kenney *et al.* (1975).

Este tipo de diluidores tem como vantagens a facilidade de preparação e a possibilidade de armazenamento por congelação, além da acessibilidade de preço e da obtenção de taxas de fertilidade elevadas (Aurich, 2011).

O fracionamento do leite, através de técnicas de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, permitiu obter frações purificadas do mesmo, entre as quais se destacam o fosfocaseinato natural e a β -lactoglobulina, pelo efeito benéfico na longevidade espermática durante a refrigeração. Apesar disso, é desconhecido o mecanismo de ação destas frações (Batellier *et al.*, 1997; Batellier *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários diluidores com composição melhor definida, utilizando apenas frações do leite, e disponíveis comercialmente, como é o caso do INRA-96® (IMV, L'Aigle, França) e do EquiPro® (Minitube Ibérica S.L., Tarragona, Espanha). O diluidor francês INRA-96® tem-se tornado muito popular em todo o mundo, e é composto por sais de Hank, HEPES, glucose, lactose e fosfoceatinatos naturais (Batellier *et al.*, 1998). Todavia, Brinsko (2011) refere que os níveis de antibiótico neste diluidor são insuficientes para o controlo bacteriano nos ejaculados de alguns garanhões, pelo que aconselha a sua suplementação com ticarcilina sódica e ácido clavulânico numa dose de 1mg/ml. Este diluidor permite uma longevidade e viabilidade ótima dos SPZ a 15°C, mas pode também ser utilizado com sucesso para refrigeração a 5°C (Batellier *et al.*, 1998). O EquiPro® consiste noutro diluidor de sémen semelhante ao INRA-96®, que contém componentes do leite definidos, mas a sua composição não se encontra publicada. Para armazenamento a 5°C, este diluidor tende a manter uma melhor qualidade de sémen, independentemente da exposição ao oxigénio, relativamente ao INRA-96® (Pagl *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2008).

A gema de ovo neutraliza os efeitos deletérios da diluição e da refrigeração através da estabilização da membrana plasmática dos SPZ. Os diluidores à base de gema de ovo permitem a obtenção de taxas de fertilidade semelhantes às obtidas com diluidores à base de leite, mas o seu processamento é mais complicado. Assim, por não apresentarem influencia marcada na qualidade do sémen e na fertilidade após

inseminação, a sua utilização não apresenta vantagens (Aurich, 2011). O AndroMed-E® consiste num diluidor composto por lecitina de soja em substituição da gema de ovo, a qual tem demonstrado sucesso limitado, pois a qualidade do sémen processado com este diluidor é inferior à qualidade do sémen processado com diluidores à base de leite, quando o período de refrigeração excede as 24h (Aires *et al.*, 2003; Aurich, 2005).

A presença de microrganismos no sémen pode também afetar negativamente a manutenção da sua viabilidade durante o armazenamento. É inevitável a contaminação do sémen durante a colheita, e além desta, pode ocorrer contaminação adicional durante a manipulação do material e reagentes utilizados, nomeadamente dos diluidores e dos recipientes usados para as diluições, bem como dos sistemas de banho-maria, sendo estes últimos conhecidos como uma fonte frequente de *Pseudomonas aeruginosa*, pois a água quente possui um ambiente propício ao desenvolvimento bacteriano. Por este motivo, o banho-maria deve ser limpo e desinfetado com frequência. A adição de antibióticos aos diluidores visa o controlo do crescimento microbiano no sémen armazenado, mantendo desta forma a qualidade do sémen. Na Europa, a adição de penicilina e gentamicina são amplamente utilizadas, inibindo eficazmente o crescimento de vários microrganismos encontrados no sémen processado sob condições *in vitro*, e tendo esta combinação efeitos tóxicos reduzidos para o sémen. A amikacina apresenta-se como alternativa à gentamicina, mas é um antibiótico mais caro e apresenta um espectro de ação que não é considerado vantajoso na Europa. Em contraste, nos Estados Unidos da América os antibióticos mais frequentemente utilizados são a amikacina, a penicilina e a ticarcilina/ácido clavulânico (Varner *et al.*, 1998; Aurich & Spergser, 2007; Aurich, 2011; Brinsko, 2011; Loomis, 2012).

Outra função importante do diluidor de sémen consiste na proteção dos espermatozoides através da neutralização de substâncias metabólicas durante o armazenamento do sémen refrigerado. Os SPZ são células muito sensíveis ao *stress* oxidativo devido ao seu alto teor em ácidos gordos polinsaturados, como já referido no

capítulo 2.1.3. Os diluidores à base de leite resultam num aumento da capacidade antioxidante do sémen diluído, provavelmente devido à interação entre o diluidor e o PS, evitando assim a perda de motilidade e de capacidade de fertilização. Têm sido feitos estudos que promovem a adição de antioxidantes, como o ácido ascórbico ou o piruvato, resultando num leve aumento da qualidade do sémen refrigerado durante o seu armazenamento (Aurich *et al.*, 1997; Bruemmer *et al.*, 2002; Kankofer *et al.*, 2005; Aurich, 2011).

Em garanhões “maus refrigeradores”, devem ser testados diferentes diluidores para encontrar a combinação ótima para cada reprodutor individualmente. Contudo, é importante ter em conta que a remoção parcial do plasma seminal é, conforme foi referido, um passo essencial para o aumento da qualidade do sémen refrigerado destes garanhões (Brinsko *et al.*, 2000a).

2.3.2. Centrifugação (lavagem de sémen)

A centrifugação do sémen tem-se tornado um método rotineiramente utilizado em programas de IA de equinos, em muitos centros de reprodução. O principal objetivo desta técnica baseia-se na remoção da maioria do PS quando o ejaculado apresenta oligospermia, baixas concentrações de SPZ ou pertence a um garanhão “mau refrigerador”. Porém, a técnica de centrifugação deve ser utilizada apenas quando necessária, durante o tratamento de sémen fresco para refrigeração, e evitada quando a sua utilização não é justificada por nenhum dos motivos supracitados (Brinsko *et al.*, 2000a; Len *et al.*, 2010; Bradecamp, 2011; Bliss *et al.*, 2012).

Mortimer (2000) reportou a existência de danos na cromatina em espermatozoides humanos pela utilização desta técnica, embora isto possa ocorrer devido à centrifugação do sémen sem antioxidantes e não por agressão direta devido à técnica em si. Resultados concordantes foram obtidos por Morrell *et al.* (2010b), que observaram que a aplicação da técnica de lavagem de espermatozoides isoladamente

não beneficia a viabilidade, motilidade nem a integridade da cromatina no sémen de garanhão, contrastando este achado com estudos anteriores (Aurich, 2005).

Idealmente, a centrifugação do ejaculado deveria permitir uma taxa de recuperação de SPZ de aproximadamente 100%, sem provocar efeitos negativos na qualidade do sémen. Contudo, e associado à utilização de protocolos de centrifugação que recomendam a utilização de forças centrífugas baixas, entre os 400 e 600 *g*, durante 10 a 15 minutos, continuam a verificar-se perdas de SPZ no sobrenadante na ordem dos 20 a 30% (Len *et al.*, 2010; Varner *et al.*, 2010; Loomis, 2011b).

Está descrito que o aumento do tempo de centrifugação ou da força gravitacional (*g*) resulta num incremento da taxa de recuperação de SPZ após centrifugação, mas, devido ao efeito das forças mecânicas associadas à centrifugação e à compactação excessiva do sémen, podem verificar-se efeitos deletérios na motilidade e qualidade do mesmo (Macpherson *et al.*, 2001; Varner *et al.*, 2010). Len *et al.* (2010), avaliaram os efeitos de diferentes forças centrífugas nos SPZ de equinos, e demonstraram que o sémen pode ser centrifugado a 900 *g* sem efeitos aparentes na qualidade espermática, aumentando desta forma a taxa de recuperação de SPZ após centrifugação.

Especialmente em garanhões “maus refrigeradores”, que apresentam motilidade espermática consistentemente baixa após refrigeração, uma técnica que pode ser utilizada é a remoção total do PS através de centrifugação do sémen fresco e a ressuspensão do *pellet* de SPZ em meio de leite desnatado e glucose, suplementado com meio de *Tyrods* modificado com alta concentração de potássio. Este procedimento permite melhorar as características cinéticas dos SPZ e não afeta a fertilidade do sémen (Padilla & Foote, 1991; Rigby *et al.*, 2001).

Mais recentemente, foi introduzida uma técnica de centrifugação com almofada (*cushion*), com o objetivo de maximizar a taxa de recuperação de SPZ sem causar prejuízo na qualidade do sémen. Esta técnica consiste na utilização de um meio especial para centrifugação (*cushion*), como o *Cushion Fluid*® comercializado pela Minitube, que contém um composto não iónico iodado denominado iodixanol. Este

meio está descrito como sendo uma solução densa, inerte e isotónica. O protocolo utilizado para este tipo de centrifugação (Fig. 11) visa a utilização de uma força centrífuga de 1000 *g* durante 20 minutos, após a deposição de 40 mL de sémen diluído, numa taxa de 1:1 com diluidor à base de leite desnatado (como o INRA-96®), num tubo de centrífuga cónico de 50 mL, onde se depositou previamente 3,5 mL de *cushion* no fundo do mesmo, sem ocorrer mistura. Para este tipo de centrifugação, a taxa de recuperação de SPZ ronda os 90 a 95% (Waite *et al.*, 2008; Loomis, 2011b; Bliss *et al.*, 2012). Recentemente, verificou-se que o volume da solução de iodixanol pode ser reduzido de 3,5 para 1 ml em tubos de centrífuga de fundo cónico, e que em certos casos pode ser favorável a utilização de tubos “*nipple-bottom*”, sem que se prejudique a qualidade do sémen (Waite *et al.*, 2008; Varner *et al.*, 2010; Bliss *et al.*, 2012).

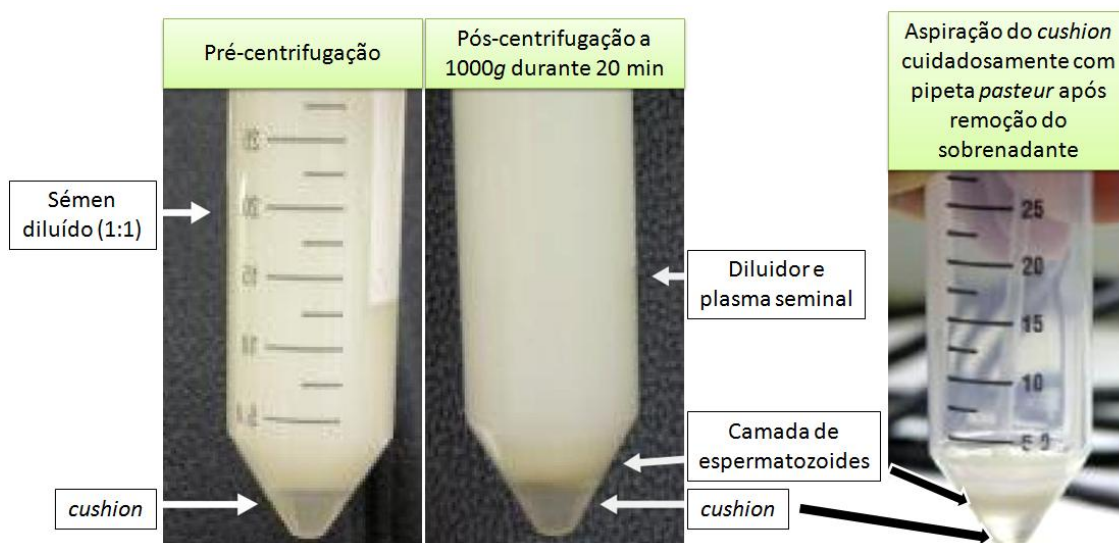


Fig. 11: Técnica de centrifugação com almofada (*cushion*; adaptado de Loomis, s.d.)

2.3.3. Refrigeração, armazenamento e transporte do sémen

O processo de monta natural em equinos (Fig. 12) ocorre com a deposição do sémen diretamente no trato reprodutivo da égua, sendo criado desta forma um “circuito fechado” para o trajeto percorrido pelo mesmo. Com a colheita, processamento e posterior IA são incrementados os riscos de agressão externa ao sémen, sendo frequentes os desvios de temperatura, pressão osmótica e exposição a contaminantes, bem como a sua exposição prolongada ao PS e a subprodutos do metabolismo durante o armazenamento (Loomis, 2006).



Fig. 12: Monta natural.

A refrigeração do sémen conduz a uma diminuição da taxa metabólica dos espermatozoides, retardando as reações químicas e o crescimento bacteriano, e prolongando a longevidade e fertilidade do sémen (Picket & Amann, 1987 citado por Katila, 2011). Os SPZ toleram bem o arrefecimento rápido até cerca dos 20°C, mas entre os 19 e os 8°C apresentam alta sensibilidade ao choque térmico, caracterizado pela diminuição da motilidade, movimentos circulares dos SPZ, e comprometimento do acrossoma e membrana plasmática. Durante esta fase, o sémen deve ser arrefecido preferencialmente a uma taxa de -0,05°C/min, sendo bem toleradas taxas $\leq -0,1^\circ\text{C}/\text{min}$. A partir dos 8°C, o arrefecimento pode ser feito mais rapidamente, sem prejudicar a qualidade do sémen (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1992, Katila, 2011).

A temperatura de armazenamento assume também uma grande importância enquanto fator condicionante da manutenção da viabilidade do sémen. Neste campo, existe alguma divergência de opiniões entre investigadores, mas são geralmente consideradas ideais para ganhões, temperaturas de armazenamento entre os 4 e 6°C (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984; Varner *et al.*, 1988; Varner *et al.*, 1989; Moran *et al.*, 1992).

Varner *et al.* (1988) demonstraram que o sémen mantido a 37°C sofre uma rápida diminuição da motilidade, enquanto o armazenamento a temperaturas de 25°C e 4°C tem resultados semelhantes às 24h. No entanto, revelam ser vantajosas temperaturas de refrigeração a 4°C quando é aumentado o período de armazenamento do sémen. Num estudo posterior, Varner *et al.* (1989), evidenciaram que o sémen mantido a uma temperatura de 20°C sofreu um decréscimo mais rápido da motilidade do que a 5°C. Alguns autores referem que a 20°C, a motilidade e a fertilidade do sémen são mantidas durante 12h, mas após esse período, o excessivo crescimento bacteriano deteriora a qualidade do mesmo (Province *et al.*, 1985; Francl *et al.*, 1987; Katila, 2011).

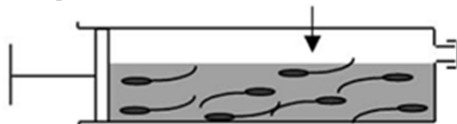
Batellier *et al.* (2001) utilizaram temperaturas de armazenamento de 15 e 5°C com diferentes diluidores, e demonstraram que o INRA-96® foi eficiente na manutenção da qualidade do sémen a estas duas temperaturas, durante 24h. Estes resultados revelam que o armazenamento a 15°C é uma boa alternativa na prevenção do choque térmico, em garanhões “maus refrigeradores”. Contudo, para manter o sémen a 15°C são necessários contentores equipados com um sistema de arrefecimento e aquecimento controlado, pelo que comercialmente apresentariam um custo mais elevado. Assim, e pela ausência de contentores comerciais com estas características, é mais popular a utilização de temperaturas de armazenamento de aproximadamente 4°C.

Relativamente ao armazenamento e transporte do sémen, a utilização de acondicionamento apropriado auxilia na manutenção da qualidade do mesmo (Brinsko *et al.*, 2000b). Estudos prévios demonstram que o armazenamento do sémen a temperaturas mais elevadas requer condições aeróbias, enquanto a uma temperatura de 4°C são recomendadas condições anaeróbias, pois a atividade dos SPZ é menos intensa, diminuindo a sua atividade metabólica (Fig. 13). Desta forma, a 4°C, o ar deve ser removido quando o sémen diluído é colocado no recipiente onde será armazenado, mantendo-se assim uma melhor motilidade espermática. No entanto, a 37°C os SPZ necessitam de oxigénio para a sua sobrevivência. É importante ter em conta que os SPZ são capazes de usar vias metabólicas aeróbias ou anaeróbias para a sua

sobrevivência, mas o acesso permanente a oxigênio pode ser prejudicial para as membranas dos mesmos, devido à peroxidação lipídica (Magistrini *et al.*, 1992; Katila, 1997; Batellier *et al.*, 1998).

Armazenamento a 15°C em condições aeróbias

Seringa de 20 mL cheia com 10 mL de sémen diluído e 10 mL de ar



Armazenamento a 4°C em condições anaeróbias

Seringa de 20 mL cheia com 10 mL de sémen diluído

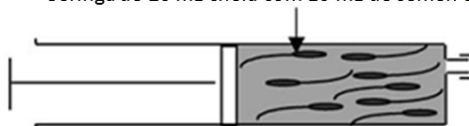


Fig. 13: Condições de armazenamento de doses de sémen para inseminação artificial a 15 e a 4°C (adaptado de Batellier *et al.*, 2001).

Outro ponto a ter em conta é a posição de armazenamento, pois o sémen armazenado horizontalmente parece ter maior percentagem de espermatozoides rápidos em comparação com o armazenado numa posição vertical (Magistrini *et al.*, 1992).

Existem diferentes formas de acondicionamento do sémen diluído para posterior refrigeração, armazenamento e transporte. Os tipos de embalagens mais comuns (Fig. 14) são as seringas plásticas de material não espermicida, os sacos (*Whirl-Pak*® ou de revestimento de biberão) e os tubos de centrífuga. A embalagem deve ser selecionada consoante o contentor de transporte a utilizar, e deve ser acompanhada por informações pertinentes acerca do ganhão e do sémen nela contido (Brinsko *et al.*, 2000a; Sheerin, 2007; Brinsko *et al.*, 2011d).

Os contentores comerciais para transporte de sémen, disponíveis hoje em dia, têm um sistema de arrefecimento passivo através de um fluido que é congelado num congelador e em seguida, gradualmente aquecido pelo calor libertado pelo sémen e pelo ar presente na câmara de armazenamento. Alguns contentores de transporte,

utilizados frequentemente, são concebidos com o objetivo de serem economicamente mais acessíveis e descartáveis, enquanto outros são feitos para durar mais tempo e são mais caros (Katila, 2011). Entre os contentores reutilizáveis, o mais utilizado é provavelmente o Equitaner® (Fig. 15a), e entre os descartáveis encontra-se a caixa de transporte de neopor, comercializada entre outros pela Minitube (Fig. 15b; Katila *et al.*, 1997; Katila, 2011). O Equitaner® tem uma taxa de arrefecimento controlado de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e mantém uma temperatura final de $4-6^{\circ}\text{C}$ por mais de 70h à temperatura ambiente de 22°C (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984). Estudos experimentais têm demonstrado que uma taxa de arrefecimento inicial de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ é desejável para maximizar a viabilidade do sémen, sendo esta obtida com a utilização de Equitaner® (Brinsko *et al.*, 2011d). As caixas de transporte de neopor apresentam uma taxa de refrigeração mais rápida do que a desejável e não têm capacidade de manter a temperatura constante. Apesar disso, a sua utilização está associada à obtenção de resultados satisfatórios se o tempo de transporte não exceder as 30h e se a temperatura ambiental for moderada, tornando-se uma opção interessante, especialmente em centros de inseminação artificial com elevada casuística (Brinsko *et al.*, 2000b; Aurich, 2008; Nunes *et al.*, 2008).



Fig. 14: Embalagens para acondicionamento de sémen refrigerado durante o transporte. a) Seringa de plástico; b) Saco *Whirl-Pak*®; c) Sacos de revestimento de biberão; d) Tubo de centrifuga (adaptado de Brinsko *et al.*, 2011c & Bedford-Guaus, 2007).



Fig. 15: Contentores comerciais para transporte de sémen refrigerado de garanhão.
a) Equitainer®; b) Caixa de transporte de neopor (Minitube; fotografias cedidas pelo Prof. Dr. António Rocha).

2.4. Utilização de técnicas de seleção de espermatozoides para aumentar a fertilidade do sémen refrigerado

Como já referido anteriormente, existe um número expressivo de garanhões que consistentemente produzem ejaculados de baixa qualidade e alta sensibilidade à refrigeração, tornando-se por isso necessária a utilização de métodos de processamento de sémen para contornar esta problemática, com o objetivo final de aumentar a taxa de fertilidade (Bradecamp, 2011; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011; Costa *et al.*, 2012).

Existe um mecanismo *in vivo*, que ocorre no trato reprodutivo da égua, responsável pela seleção de espermatozoides. Em situações de monta natural, o sémen é ejaculado diretamente no útero da égua, sendo aí depositados dezenas de milhares de milhões de espermatozoides que são sujeitos a mecanismos de seleção durante o seu trajeto até ao local da potencial fertilização. Estes mecanismos promovem a filtração de células imaturas ou danificadas, ao mesmo tempo que os SPZ viáveis adquirem capacidade fertilizante. Desta forma, à junção istmo-ampolar no oviducto (Fig. 16), apenas chegam alguns milhares de espermatozoides funcionalmente normais, e

apenas um irá eventualmente fertilizar o oócito (Suarez, 2007). Após deposição do ejaculado, que ocorre diretamente no útero, alguns espermatozoides aderem ao epitélio uterino enquanto outros permanecem no lúmen, apresentando estes últimos maior probabilidade de lesão das suas membranas plasmáticas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1990 citado por Morrell & Rodríguez-Martínez, 2011). Assim, o útero pode atuar ao mesmo tempo como um reservatório de sêmen e como mecanismo de filtração, embora este último seja baseado em interações

diretas entre os espermatozoides e as células epiteliais uterinas, e não como uma barreira física (Morrell & Rodríguez-Martínez, 2011). A junção útero-tubárica atua presumivelmente como o principal filtro (Morrell & Rodríguez-Martínez, 2011), constituindo com o istmo distal um reservatório e sistema de filtração de sêmen. Pensa-se que os espermatozoides que, temporariamente, se ligam às células epiteliais uterinas ou às células epiteliais da junção útero-tubárica posteriormente se tornam livres para percorrer o oviduto numa direção anterógrada. A seleção que ocorre no oviduto é realizada por proteínas aí existentes, que têm capacidade de modificar a zona pelúcida de oócitos recém-ovulados, afetando desta forma a sua interação com os espermatozoides (Morrell & Rodríguez-Martínez, 2011). Estudos realizados em humanos demonstraram que desta forma são selecionadas subpopulações de espermatozoides com ligandos específicos que possibilitam a ocorrência de fertilização (Munuce *et al.*, 2009).

Em casos de IA, os SPZ são também depositados no útero (Fig. 17), tal como em condições de monta natural. Por este motivo, os mecanismos de seleção e interações

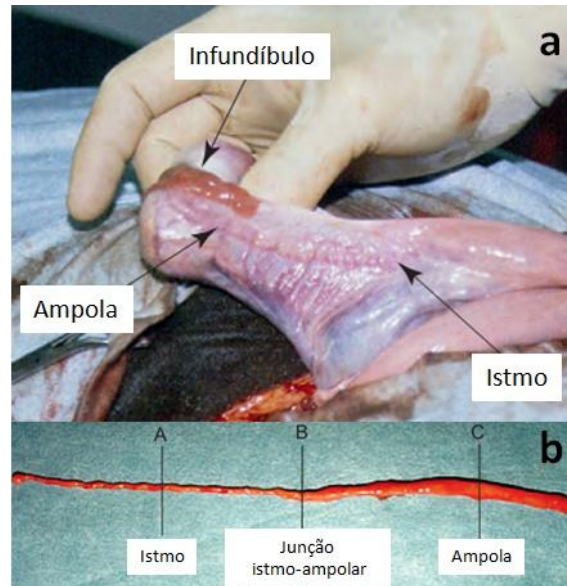


Fig. 16: a) Superfície lateral do ovário, oviduto (infundíbulo, ampola, e istmo) e final do corno uterino, exposto através de laparotomia; b) Oviduto dissecado (adaptado de Brinsko *et al.*, 2011b).



Fig. 17: Inseminação artificial em égua.

no trato reprodutivo da égua são semelhantes nas duas técnicas de reprodução. No entanto, é essencial que as técnicas de manipulação de sémen prévias não comprometam as membranas plasmáticas, a motilidade e a longevidade dos espermatozoides, uma vez que, caso isso ocorra, prejudicará a sua capacidade de progressão no trato reprodutivo da fêmea (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

A presença de SPZ mortos ou de fraca qualidade no sémen tem sido apontada como um fator prejudicial à motilidade e fertilidade dos restantes SPZ, pelo que a sua remoção pode permitir uma maximização da qualidade pós-processamento do sémen refrigerado. Têm sido sugeridos vários mecanismos que mimetizam a seleção de espermatozoides de boa qualidade, que ocorre no trato reprodutivo da égua. Estes métodos podem separar os espermatozoides do plasma seminal e, além disso, melhorar a qualidade dos espermatozoides presentes no restante ejaculado, sendo selecionados apenas as células móveis, com morfologia normal e ADN (ácido desoxirribonucleico) intacto (Morrell, 2006; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009; Loomis, 2011b).

Os métodos de seleção biomimética podem ser divididos em dois grupos: métodos que resultam apenas na remoção do plasma seminal (lavagem de sémen) e métodos de seleção de espermatozoides baseados em determinadas características, tais como a migração (baseada na motilidade), filtração (baseada na integridade da membrana) e centrifugação com coloide (baseada na motilidade, morfologia, viabilidade e integridade da cromatina). A centrifugação com coloide pode ainda ser dividida em centrifugação por gradiente de densidade (CGD) e centrifugação com monocamada de coloide (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

No ponto 2.3.2. da presente dissertação, foi descrito o método de lavagem de sémen. Esta técnica de centrifugação consiste na separação da maioria do plasma seminal do sémen, sem ocorrer seleção de espermatozoides nem remoção de espécies reativas ao

oxigénio (Hallap *et al.*, 2004; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

Na Tabela 1 podem observar-se algumas características dos diferentes métodos de seleção passíveis de serem utilizados para preparação de sémen de equinos, com vista a maximizar a sua viabilidade e resistência à refrigeração.

Tabela 1: Propriedades dos diferentes métodos de separação e seleção de sémen (adaptado de Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009 e Len *et al.*, 2010).

Técnica de separação	Lavagem	Migração	Filtração	Centrifugação com coloide
Facilidade de uso	Simples	Simples	Simples	Requere algum cuidado
Equipamento necessário	Centrífuga	Tubos especiais para migração	Centrífuga, eventualmente	Centrífuga
Consumíveis	Tubos de centrífuga	Tubos especiais para migração/ sedimentação	Fibra de vidro, <i>Sephadex</i> , filtros	Coloides
Custo por amostra	O menor	Baixo, a menos que o meio contenha ácido hialurónico	Alto	O maior
Seleção de SPZ	Nenhuma	Baseada na motilidade	Baseada na motilidade, morfologia e acrossomas intactos	Baseada na motilidade, morfologia, viabilidade, qualidade da cromatina e possivelmente em acrossomas intactos
Remoção de PS	A maioria	Sim	Algum	Sim
Remoção de patogéneos	Não	-	-	Sim
Remoção de ROS	Não	Sim	-	Sim
Detritos	Podem estar presentes	Ausentes	Podem estar presentes	Ausentes
Taxa de recuperação de SPZ móveis	70-80%	10-20%	60-85%	>50%
Leucócitos	Presentes	Removidos	Removidos	Removidos
Cromatina	Pode ser fraca	Pode ser fraca	Conflito de dados	Boa
Acrossoma	Efeito desconhecido	Pode estar danificado	Aumento da % de intactos	Aumento da % de intactos
Outros	-	Ácido hialurónico contido no meio pode induzir reação do acrossoma	Contaminação, por exemplo por fibras de vidro	Possível problema de endotoxinas e PVP com Percoll®

ROS - Espécies reativas ao oxigénio; PS - plasma seminal; SPZ - espermatozoides.

2.4.1. Migração (*Swim-up*)

A técnica de migração (*swim-up*) é o método mais simples para separar os SPZ móveis dos outros componentes do sémen. A seleção é baseada na capacidade dos SPZ nadarem a partir do sémen para o meio de cultura, separando-se assim do PS. Desta forma, esta técnica não promove qualquer seleção com base na morfologia, integridade da cromatina, viabilidade ou integridade do acrossoma. Existem estudos que demonstram que a técnica de migração tem sido utilizada em sémen de garanhões férteis, com um aumento significativo na motilidade progressiva e redução nas anomalias da cauda e trato intermédio (TI) após migração, relativamente à lavagem de sémen, pois estas anomalias morfológicas dificultam a capacidade dos SPZ migrarem (Somfai *et al.*, 2002; Hallap *et al.*, 2004; Loomis, 2011b).

A adição de ácido hialurónico ao meio de migração resulta numa recuperação significativamente mais elevada de SPZ móveis e membrana intacta. Apesar disso, a taxa de recuperação de SPZ móveis ronda os 10 a 20%, tornando este método impraticável para a preparação de doses de IA na maioria das espécies animais, sendo mais apropriado para fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de SPZ. Devido à baixa produtividade e aos volumes de processamento associados a esta técnica, esta torna-se inapropriada para a separação de SPZ de ejaculados para refrigeração ou congelação (Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994; Hallap *et al.*, 2004; Loomis, 2011b).

2.4.2. Filtração

A técnica de filtração de sémen baseia-se na capacidade móvel dos SPZ e na sua interação com a matriz do filtro (fibra de vidro, esferas de *Sephadex* ou poros da membrana), à qual aderem mais facilmente as células não viáveis, ao contrário das funcionais e móveis. Os mecanismos de aderência não estão totalmente esclarecidos, mas especula-se que a aglomeração de SPZ imóveis e mortos às partículas de *Sephadex* seja devida a alterações das cargas de superfície, ou de proteínas presentes na

superfície de espermatozoides capacitados (Ahmad *et al.*, 2003; Januskauskas *et al.*, 2005; Bussalleu *et al.*, 2008).

Este método permite eliminar leucócitos do sémen, os quais são fontes de ROS, e selecionar SPZ móveis e morfológicamente normais, possivelmente com acrossomas intactos (Ibrahim *et al.*, 2001; Henkel & Schill, 2003)

Num estudo realizado por Sieme *et al.* (2003), foi demonstrado um aumento significativo da motilidade e integridade da membrana dos SPZ após filtração de sémen de garanhão, enquanto, após a centrifugação para lavagem de sémen ambos os parâmetros foram prejudicados. Além disso, após o armazenamento deste sémen refrigerado durante 48h, a sua qualidade mostrou-se superior quando comparado com o sémen centrifugado e diluído. Desta forma, a técnica de filtração revela bastante interesse para a refrigeração e armazenamento de sémen equino durante longos períodos.

Uma das vantagens da filtração é a taxa de recuperação de SPZ ser superior relativamente a outros métodos, aproximadamente 63%. No entanto, o PS e os detritos celulares não são removidos na totalidade, pelo que, comparando com outros métodos de separação de sémen, este não é tão limpo (Henkel & Schill, 2003; Januskauskas *et al.*, 2005).

2.4.3. Centrifugação com coloide

Estas técnicas consistem na centrifugação de sémen diluído através de coloides, que permitem a separação do plasma seminal e selecionam os espermatozoides móveis, viáveis e com boa integridade da cromatina (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

A centrifugação com coloide era, até há poucos anos, confinada apenas à centrifugação por gradiente de densidade (CGD), a qual envolve a utilização de várias camadas de coloide de diferentes densidades. Recentemente, um novo método designado por centrifugação com monocamada (SLC) através de um coloide espécie-

específico (Androcoll®) foi desenvolvido por investigadores da *Swedish University for Agricultural Sciences*, o qual utiliza apenas uma camada de Androcoll® (Morrell *et al.*, 2008; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

Na Tabela 2 estão resumidas algumas vantagens e desvantagens das duas técnicas de centrifugação com coloide supracitadas.

Tabela 2: Comparação entre a técnica de centrifugação com monocamada de Androcoll-E® com a técnica de centrifugação por gradiente de densidade (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009).

Técnica de separação	CGD	SLC de Androcoll-E®
Facilidade em colocar as camadas	Sémen sobre várias camadas de coloide	Sémen sobre uma camada única de coloide
Tempo de preparação	Mais longo, pois tem mais camadas	Inferior a CGD
Qualidade da preparação	Boa	Igual a CDG
Taxa de recuperação de SPZ	Pode ser mais baixa do que para SLC	Pode ser mais elevada do que para CGD

CGD - Centrifugação por gradiente de densidade; SLC - centrifugação com monocamada;

SPZ - espermatozoides.

2.4.3.1. Centrifugação por gradiente de densidade (CGD)

A CGD consiste numa técnica de seleção de sémen baseada na separação dos SPZ em subpopulações com diferentes densidades específicas. A separação dos espermatozoides é realizada com base na motilidade e morfologia, pois a maioria dos espermatozoides normais passam através dos gradientes e formam um *pellet* no fundo do tubo, enquanto os espermatozoides morfologicamente anormais ou sem motilidade, células epiteliais, leucócitos, bactérias e detritos celulares ficam retidos na interface entre os gradientes ou suspensos num dos mesmos. Isto ocorre porque, durante esta centrifugação, as células se movem para o ponto no qual o gradiente corresponde à sua própria densidade. Assim, o PS permanece na região superior do gradiente, enquanto os SPZ móveis se deslocam na direção da força centrífuga, mais rapidamente que os imóveis, e formam um *pellet* (Fig. 18). Uma cuidadosa seleção da

velocidade e do tempo de centrifugação é a “chave” que permite separar os SPZ móveis dos imóveis (Parrish *et al.*, 1995; Macpherson *et al.*, 2002; Loomis, 2006; Morrell, 2006).

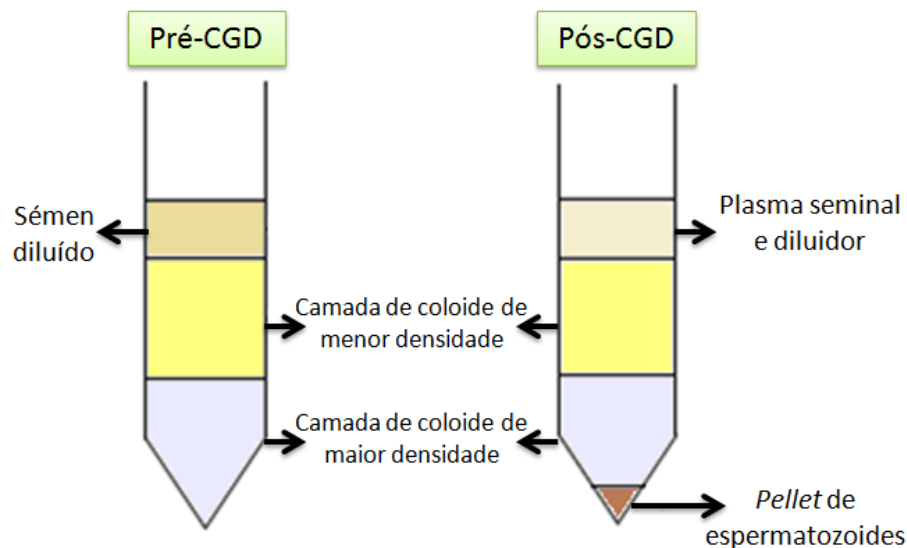


Fig. 18: Centrifugação por gradiente de densidade (CGD). O gradiente de densidade é composto pelo menos por duas camadas de colóides de densidades diferentes, sendo o sémen diluído depositado sobre a parte superior da camada de colóide de menor densidade. Após centrifugação, forma-se um *pellet* de espermatozoides no fundo do tubo, enquanto o sobrenadante é constituído por plasma seminal e diluidor de sémen.

O gradiente mais utilizado nesta técnica é o Percoll®, composto por partículas de sílica coloidal cobertas por polivinilpirrolidona (PVP). Todavia, as preocupações com a toxicidade potencial da PVP e a possibilidade de este poder conter endotoxinas resultou na remoção do seu uso clínico em humanos. Posteriormente, têm sido introduzidos no mercado colóides compostos por partículas de sílica cobertas por silano, em substituição do gradiente de Percoll®. Estes colóides têm como vantagens serem autoclaváveis, reduzindo assim os níveis de endotoxinas, e estáveis durante longos períodos de tempo em solução salina, o que permitiu obter formulações comerciais estandardizadas dos mesmos. As formulações espécie-específicas possibilitam uma melhor seleção de sémen de garanhão e sua sobrevivência, como é o caso do EquiPure® (Mortimer, 2000; Morrel & Rodriguez-Martinez, 2009).

Esta técnica, apesar de proporcionar bons resultados na melhoria da qualidade seminal, é complexa e apresenta limitações, pois apenas permite processar baixos volumes de sémen de cada vez, o que impõe um obstáculo prático à sua utilidade no trabalho de campo em garanhões. Além disso, consistentemente produz uma taxa de recuperação de SPZ baixa, o que pode impedir a sua utilização no processamento de ejaculados de baixa qualidade (Morrell *et al.*, 2005; Morrell *et al.*, 2009b).

2.4.3.2. Centrifugação com monocamada (SLC) de Androcoll-E®

O protocolo de centrifugação com monocamada de Androcoll-E® consiste numa simplificação da técnica de CGD. Esta centrifugação é realizada utilizando apenas uma camada única de coloide de sílica com uma formulação espécie-específica (Androcoll-E®) como gradiente de densidade, ficando o PS retido no topo do coloide enquanto os SPZ de boa qualidade formam um *pellet* no fundo do tubo durante a centrifugação (Fig. 19; Morrell, 2006).

Este método de preparação de sémen permite selecionar subpopulações de SPZ com boa motilidade, morfologia normal, membranas intactas e boa integridade da cromatina, sendo estes parâmetros conservados durante um período de tempo superior, relativamente aos espermatozoides não selecionados (Johannisson *et al.*, 2009; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009). Um estudo recente demonstrou que amostras de sémen submetidas a SLC e refrigeradas a 6°C podem conservar a capacidade fertilizante durante 96h de armazenamento (Lindahl *et al.*, 2012).

A técnica de SLC é um recurso particularmente apelativo para aplicação em garanhões “maus refrigeradores”, pois apesar do custo associado à mesma, a melhoria na longevidade do sémen pode trazer benefícios em termos de fertilidade (Morrell, 2011).

Um estudo realizado por Morrell *et al.* (2011b), com um pequeno número de garanhões “problema” (sémen de má qualidade ou taxa de fertilidade de 0-20%), indicou que após SLC ocorreu melhoria na qualidade do sémen e foi possível recuperar espermatozoides suficientes de cada garanhão individualmente para IA, levando a um

efeito positivo na fertilidade, apesar destes resultados não serem estatisticamente representativos.

Em 2009b, Morrell *et al.*, publicaram um estudo no qual foi proposto um protocolo para processar volumes de sémen superiores, por forma a permitir tornar a técnica de SLC aplicável na prática diária de reprodução de equinos. Assim, a utilização da técnica com Androcoll-E®-Large permitiu o processamento de 18 mL de sémen diluído em 15 mL de coloide por tubo de centrífuga de 50 mL. Desta forma, foi ultrapassado o problema relativo ao pequeno volume de sémen que a técnica de CGD permitia processar.

As aplicações mais importantes desta técnica consistem na melhoria da qualidade do sémen para doses de IA; aumento do tempo de semivida das amostras de sémen armazenadas *in vitro*; remoção de agentes patogénicos presentes no ejaculado; melhoria na crio-sobrevivência através da remoção de espermatozoides mortos e anormais antes da criopreservação, ou seleção dos espermatozoides vivos pós-descongelação; seleção dos espermatozoides morfológicamente normais e com boa integridade da cromatina para a IA, injeção intracitoplasmática ou fertilização *in vitro*, aumentando assim a taxa de zigotos que se desenvolvem até à fase de blastocisto (revisão realizada por Morrell, 2011).

Pela comparação das duas técnicas de centrifugação com coloide (CGD e SLC), tem sido demonstrado que a qualidade do sémen obtido após processamento é semelhante (Morrell *et al.*, 2009a; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009). Em contrapartida, Macpherson *et al.* (2002), referem que a técnica de SLC apresenta uma melhor qualidade do sémen nas suspensões de espermatozoides, além de apresentar como vantagens a simplicidade e economia de tempo na sua realização, quando comparada com a técnica de CGD.

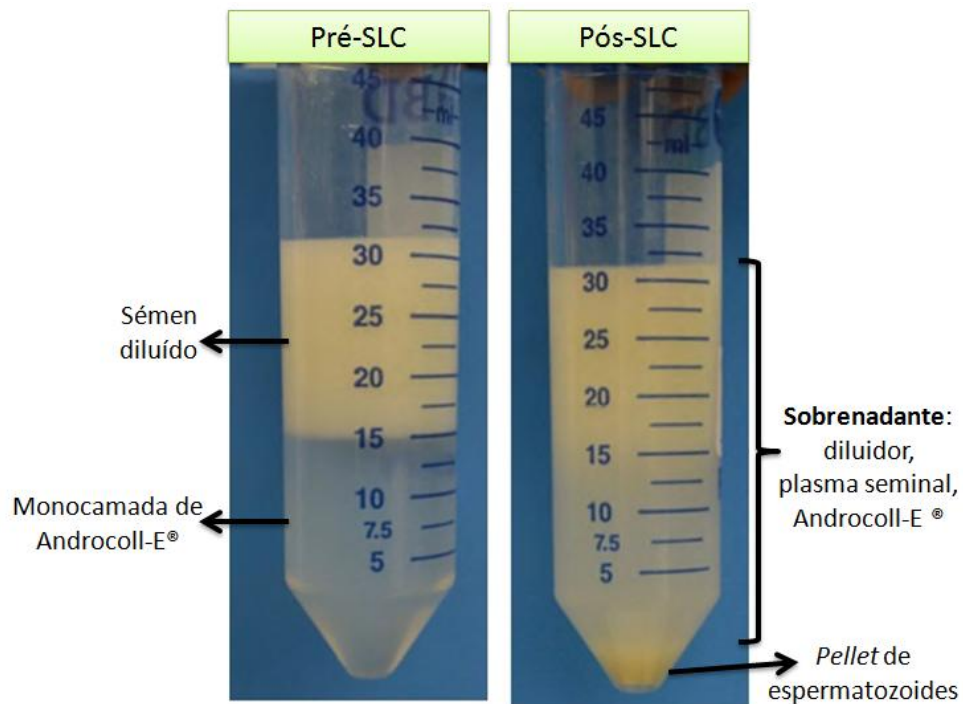


Fig. 19: Centrifugação com monocamada (SLC) de coloide Androcoll-E®. O sémen diluído é depositado sobre a parte superior da monocamada de coloide Androcoll-E® e após centrifugação forma-se um *pellet* de espermatozoides no fundo do tubo, enquanto o sobrenadante é constituído por plasma seminal, diluidor de sémen e coloide (fotografia cedida pelo Prof. Dr. António Rocha).

III. Trabalho experimental

3.1. Introdução

Alguns garanhões têm sémen de alta qualidade e com boa resistência à refrigeração, mas existe uma percentagem significativa de animais que requer técnicas de processamento especializadas, diminuindo assim a sensibilidade à refrigeração pela otimização da sua qualidade, com o objetivo de maximizar as taxas de gestação obtidas por IA (Bradecamp, 2011). Brinsko *et al.* (2000a) definiu como “maus refrigeradores” os garanhões cujo sémen produzido tem uma quebra $\geq 40\%$ na motilidade progressiva (MP) após 24h de refrigeração e armazenamento, enquanto os “bons refrigeradores” têm uma redução $\leq 30\%$ nas mesmas condições.

Foi recentemente desenvolvido um novo protocolo de seleção de espermatozoides denominado centrifugação com monocamada (SLC) de Androcoll-E[®], que permite fazer a sua seleção com base na motilidade elevada, morfologia normal, membranas intactas e boa integridade da cromatina (Morrell *et al.*, 2009b; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009). Estudos prévios têm demonstrado que os SPZ selecionados conservam a sua motilidade, viabilidade e integridade da cromatina por um período de tempo superior, quando comparados com espermatozoides que não foram sujeitos a esta técnica de seleção (Johannisson *et al.*, 2009).

Algumas das aplicações práticas desta técnica relacionam-se com o melhoramento da qualidade das doses de sémen para IA e com a diminuição da sensibilidade dos SPZ à refrigeração a 4-6°C, sobretudo em garanhões “problema”, como também com o aumento da “vida útil” de amostras de sémen normais (Morrell, 2011).

Até à data de início deste trabalho experimental, todos os dados publicados sobre a seleção de espermatozoides com Androcoll-E[®] eram provenientes de grupos de investigação que envolviam a investigadora que desenvolveu o produto. Assim, com este trabalho, pretendeu-se verificar os resultados obtidos por um grupo de

investigação independente, utilizando o Androcoll-E® em condições comerciais, e não em condições controladas de experimentação, analisando a aplicabilidade do mesmo na reprodução equina.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da SLC, utilizando o coloide Androcoll-E®, na qualidade do sémen (motilidade e morfologia espermáticas) após a refrigeração e armazenamento das amostras durante 72h.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Garanhões e colheita de sémen

Foram obtidos um ejaculado (Fig. 3) de cada um de nove garanhões férteis (cinco Puro Sangue Lusitano, PSL, um Sela Francês e três Puro Sangue Inglês, PSI), com idades compreendidas entre os seis e os 24 anos, durante o período de abril a junho de 2012.

Todos os ejaculados foram colhidos nas instalações do Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP). Dois dos garanhões em estudo (um PSI e um PSL) eram residentes nas instalações do CRAV e os restantes pertenciam a proprietários que recorreram aos serviços médico-veterinários desta equipa.

Para a colheita de sémen utilizou-se um manequim de monta (Fig. 6a) ou éguas em cio (Fig. 6b), sendo o ejaculado colhido através de uma VA (modelo Hannover, Fig. 7c; Colorado, Fig. 7a; INRA; Missouri, Fig. 7b, dependendo do garanhão). A VA era cheia com água quente, pretendendo-se uma temperatura interna da mesma entre 45 e 50°C, testada com termómetro no interior (Fig. 20). A pressão interna da VA



Fig. 20: Enchimento da vagina artificial com água quente, para obtenção de temperatura interna de 45-50°C.

variava com o tamanho do pênis e a preferência do garanhão e, exceto na VA modelo Missouri, era utilizada uma bainha sanitária plástica. Era colocado gel lubrificante não espermicida estéril (Minitube Ibérica S.L., ref. 17116/7000) para a lubrificação da VA imediatamente antes da colheita.

Após a colheita, o processamento do sémen era imediatamente realizado no Laboratório de Reprodução Equina, nas mesmas instalações.

3.2.2. Avaliação dos ejaculados frescos: volume, concentração, motilidade subjetiva e morfologia

A remoção da fração gelatinosa do ejaculado foi feita através de filtros de gel de *nylon* 3,5" (Minitube Ibérica S.L., ref. 11231/0400; Fig. 21a), incorporados no recipiente de colheita de sémen, ou, no caso da utilização de VA modelo Missouri, foi realizada a partir do recipiente de colheita para um recipiente pré-aquecido a 37°C

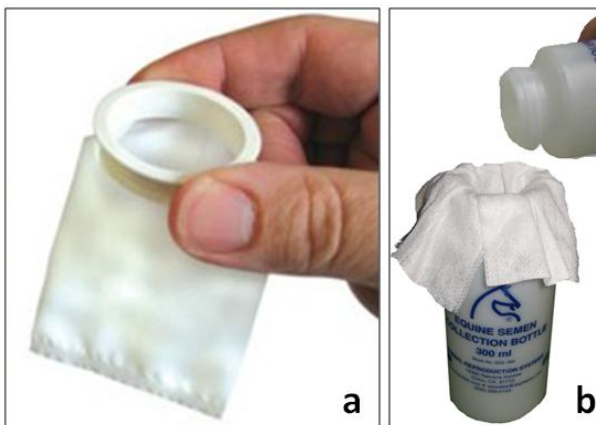


Fig. 21: Filtração do sémen. a) Filtro de *nylon*; b) Filtração através de compressas, a partir do recipiente de colheita para um recipiente pré-aquecido a 37°C (adaptado de Anónimo, s.d.).

através de compressas (Fig. 21b). Na VA Missouri utilizou-se este procedimento, pois neste modelo os filtros de *nylon* não se adaptam aos recipientes de colheita. Os recipientes de colheita apresentavam uma escala através da qual foi medido diretamente o volume de sémen filtrado (Fig. 22).

A concentração do sémen foi quantificada utilizando o espectrofotômetro SpermaCue® (Minitube Ibérica S.L.; Fig. 4b), sendo confirmada em hemocitômetro (Fig. 4a) aquando da obtenção de valores inferiores a 150×10^6 SPZ/mL.



Fig. 22: Medição do volume de sémen filtrado através da escala incorporada no recipiente de colheita de sémen (adaptado de Crabtree, 2010).

A motilidade do sémen fresco foi avaliada subjetivamente pelo operador, colocando uma gota de sémen puro entre uma lâmina e lamela aquecidas previamente a 37°C, e observando-se em microscópio ótico com platina aquecida à mesma temperatura e com uma ampliação de 200x.

Para a avaliação da morfologia espermática foram avaliados esfregaços corados com *Diff-Quick*® em microscópio ótico (Zeiss Primo Star®, Minitube Ibérica S.L., ref. 12006/0017), utilizando uma ampliação de 1000x e óleo de imersão, com supervisão de um operador experiente. Em cada esfregaço foram observados 100 espermatozoides em campos aleatórios para averiguar a presença de anomalias, classificadas de acordo com a sua localização: cabeça, trato intermédio ou cauda. Quando se observou mais do que uma anomalia no mesmo espermatozoide foi considerada apenas a de maior importância.

3.2.3. Processamento dos ejaculados

Imediatamente após a avaliação, os ejaculados foram divididos em duas amostras: uma para controlo (C) e a outra para centrifugação com monocamada (SLC) de Androcoll-E®.

No caso da primeira, a amostra controlo foi colocada em tubos *Falcon* de 15 mL (Greiner bio-one, ref. 1798K) ou de 50 mL (Greiner bio-one, ref. 1799A) e diluída para uma concentração de $25\text{-}50 \times 10^6$ SPZ/mL com diluidor INRA-96® (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França) a 37°C (Fig. 23).

As amostras destinadas a centrifugação com Androcoll-E®, foram processadas seguindo o protocolo descrito por Morrell *et al.* (2011a) com algumas modificações

(Anexo 2). O coloide, Androcoll-E®-Large (SLU, Uppsala, Suécia), foi equilibrado à temperatura ambiente, e de seguida colocaram-se 15 mL do mesmo em cada um de dois tubos *Falcon* de 50 mL. Pipetou-se cuidadosamente 15-18 mL de sémen diluído a 100×10^6 SPZ/mL com meio de *Kenney*, formando uma monocamada no topo do coloide em cada um dos tubos (Fig. 19), e centrifugou-se durante 20 min a 500 *g*. O sobrenadante foi desprezado e após uma nova quantificação da concentração em hemocitómetro, o *pellet* foi diluído a 50×10^6 SPZ/mL com diluidor INRA-96® (Fig. 23).

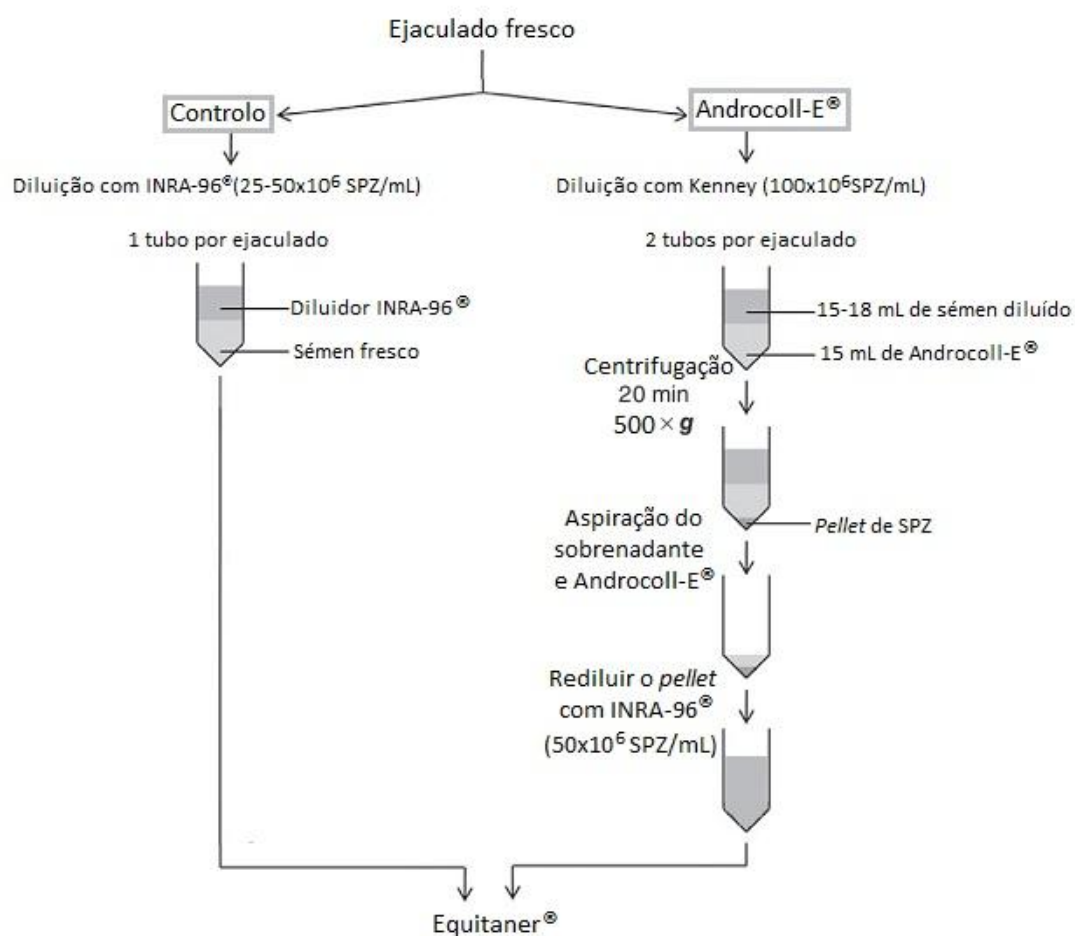


Fig. 23: Representação esquemática do processamento dos ejaculados, utilizando a diluição controle para refrigeração (esquerda) e a centrifugação com monocamada de Androcoll-E® (direita; SPZ: espermatozoides; adaptado de Hoogewijs *et al.*, 2011).

Após processamento, as duas amostras foram colocadas em Equitaner® (Minitube Ibérica S.L., ref. 17220/0010; Fig. 15a), onde previamente foram colocadas duas latas refrigeradoras específicas para uso neste equipamento, congeladas a -20°C pelo menos durante 24h antes da sua utilização. O Equitaner® foi mantido a uma temperatura ambiente de cerca de 22°C e não foram realizadas medições da sua temperatura interior. As amostras de maior volume foram armazenadas em tubos *Falcon* de 50 mL e colocadas diretamente no copo isotérmico, enquanto as de pequeno volume foram mantidas em tubos *Falcon* de 15 mL colocados no mesmo copo mas envolvidos por uma proteção isolante (Fig. 24), para impedir uma curva de refrigeração demasiado acentuada, conforme indicações do fabricante. Assume-se que a curva de refrigeração para este equipamento corresponde à descrita por Douglas-Hamilton *et al.* (1984), na qual os autores constataram uma diminuição controlada de -0.3°C/min, sendo mantida uma temperatura final de 4-6°C por mais de 70h, quando o Equitaner® é conservado a uma temperatura ambiental de 22°C. Todas as amostras foram armazenadas de forma anaeróbia.



Fig. 24: Amostras de sémen de menor volume armazenadas em tubos *Falcon* de 15 mL, envolvidos por uma proteção isolante no copo isotérmico do Equitaner® (fotografia cedida pelo Prof. Dr. António Rocha).

3.2.4. Avaliação das amostras processadas às 0, 24, 48 e 72 horas

3.2.4.1. Motilidade subjetiva (MSub)

Foi colocada uma gota de sémen de cada uma das amostras numa lâmina com câmaras de contagem de 16 micra de profundidade (ISAS®-D4C16, Proiser, Valência, Espanha; Fig. 25) previamente aquecida a 37°C. A motilidade foi estimada utilizando um microscópio ótico de platina aquecida (37°C), com uma ampliação de 200x. Esta análise foi realizada para cada uma das amostras C e SLC às 0h, 24h, 48h e 72h após processamento.

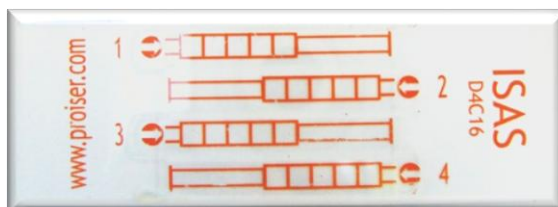


Fig. 25: Câmara de contagem de 16 micra de profundidade (ISAS®).

3.2.4.2. Parâmetros do ISAS®

Para cada uma das amostras C e SLC anteriormente colocadas nas câmaras de contagem de 16 micra de profundidade (Fig. 25), foram avaliados os parâmetros de motilidade com recurso a um sistema de análise de sémen computadorizado (ISAS®, Proiser, Valência, Espanha) e um microscópio equipado com platina aquecida a 37°C (ampliação 200x). As definições do *software* foram previamente otimizadas para espermatozoides de garanhão (Tabela 3).

Os parâmetros avaliados foram a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), percentagem de células rápidas (Ráp), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), velocidade média (VAP) e índice de oscilação (IO).

Tabela 3: Definições utilizadas no sistema de análise de sémen computadorizado (ISAS®).

Definição	Valor
Número de imagens/segundo	25/seg
Tamanho máximo das células	75 µm
Tamanho mínimo das células	4 µm
Velocidade das células rápidas	>90 µm/seg
Linearidade	35%
Temperatura	37°C

3.2.5. Morfologia espermática às 72h

A avaliação da morfologia espermática nas amostras C e SLC às 72h foi realizada conforme descrito em 3.2.2.

3.2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica®, versão 10 (StatSoft, 2011). Os dados estão expressos em valores médios e desvio padrão (média±σ).

Para os dados de motilidade subjetiva (MSub) e parâmetros aferidos no *software* ISAS® verificou-se, através de uma análise de variância fatorial, que não havia interação entre os dois fatores a testar: tempo (0, 24, 48 e 72 horas após processamento) e método de processamento do sémen (C e SLC). Assim, para determinar o efeito do método de processamento do sémen foi realizada uma análise de variância com um único fator (*One-way ANOVA*) para cada um dos tempos estudados, seguida de um teste *post-hoc* de *Scheffé* quando foram detetadas diferenças significativas. Para determinar se havia diferenças entre os grupos C e SLC na morfologia espermática às 72 horas, realizou-se uma análise de variância. Consideraram-se diferenças significativas quando $p < 0,05$.

3.3. Resultados

Na Tabela 4, estão representados os valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados para as amostras dos nove ejaculados frescos imediatamente após colheita. Pela análise destes valores, podemos afirmar que a maioria dos valores médios destes parâmetros se encontram dentro dos valores padrão para a espécie equina (Crabtree, 2010), exceto o volume filtrado, que se encontra ligeiramente acima.

Tabela 4: Valores médios $\pm\sigma$, mínimos, máximos e padrão (Crabtree, 2010) dos parâmetros analisados no sémen fresco imediatamente após colheita (n=9).

Parâmetro	Média $\pm\sigma$	Mínimo	Máximo	Valor padrão
Concentração ($\times 10^6$ SPZ/mL)	195,8 \pm 91,1	126	365	100-500
Volume filtrado (mL)	95,1 \pm 57,3	21	200	20-80
Motilidade Subjetiva (%)	53,3 \pm 7,9	40	65	\geq 40
Morfologia normal (%)	61,8 \pm 18,6	37	91	\geq 50

σ – Desvio padrão.

Os valores médios e desvios padrão para cada parâmetro de motilidade, por tempo e processamento, são apresentados na Tabela 5. Para todos os parâmetros de cinética espermática analisados, apenas foram detetadas diferenças significativas entre processamento na análise global às 24h ($p < 0,01$), sendo estas encontradas unicamente na VCL ($p = 0,03$) e VSL ($p = 0,01$). Nestes dois parâmetros o valor médio é superior no sémen tratado com SLC em relação ao controlo. É de notar uma diminuição numérica nos valores médios das características cinéticas dos espermatozoides, ao longo do tempo de conservação, sendo esta mais acentuada na amostra controlo.

Tabela 5: Valores médios $\pm\sigma$ das características cinéticas dos ejaculados às 0, 24, 48 e 72h para cada um dos processamentos de sêmen realizados (n=9).

Tempo de refrigeração		0h		24h		48h		72h	
Processamento		C	SLC	C	SLC	C	SLC	C	SLC
ISAS®	MP (%)	35,5 \pm 10,2	46,0 \pm 13,2	25,0 \pm 14,5	39,7 \pm 13,6	20,4 \pm 13,8	34,3 \pm 13,2	19,2 \pm 13,1	23,3 \pm 11,0
	MT (%)	59,5 \pm 12,0	65,0 \pm 12,4	48,2 \pm 23,0	57,2 \pm 13,4	38,7 \pm 20,5	51,3 \pm 14,7	38,2 \pm 21,7	39,0 \pm 14,7
	Ráp (%)	28,4 \pm 11,1	27,1 \pm 13,2	14,8 \pm 9,2	22,3 \pm 8,1	13,4 \pm 9,8	21,7 \pm 12,7	13,4 \pm 10,6	14,4 \pm 12,3
	VCL (μ m/s)	87,6 \pm 9,8	82,0 \pm 10,0	69,5 \pm 11,1*	80,8 \pm 8,8†	70,9 \pm 11,9	82,9 \pm 16,1	73,5 \pm 13,8	76,9 \pm 20,3
	VSL (μ m/s)	33,8 \pm 9,2	41,9 \pm 10,8	22,4 \pm 2,7*	31,7 \pm 9,0†	21,3 \pm 2,7	29,4 \pm 7,7	21,0 \pm 4,5	25,6 \pm 6,4
	VAP (μ m/s)	56,7 \pm 9,2	57,5 \pm 10,1	39,5 \pm 6,8	47,2 \pm 8,3	38,4 \pm 6,6	44,9 \pm 9,4	38,1 \pm 7,9	40,4 \pm 10,2
	IO (%)	64,6 \pm 5,6	70,3 \pm 9,0	56,7 \pm 2,6	58,6 \pm 9,0	54,2 \pm 2,9	54,2 \pm 4,6	51,9 \pm 4,8	52,8 \pm 3,9
MSub (%)		63,3 \pm 11,7	62,2 \pm 11,2	39,4 \pm 19,1	52,2 \pm 13,9	31,7 \pm 20,9	39,4 \pm 16,9	23,8 \pm 20,1	29,4 \pm 17,2

*†Médias na mesma linha com símbolos distintos indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Valores médios na mesma linha sem símbolos não têm diferenças significativas ($p>0,05$).

Parâmetros do ISAS®: C - refrigeração controle; SLC - centrifugação com monocamada de Androcoll-E®; MP - motilidade progressiva; MT - motilidade total; Ráp - rápidos;

VCL - velocidade curvilínea; VSL - velocidade retilínea; VAP - velocidade média;

IO - índice de oscilação; MSub - motilidade subjetiva; σ – desvio padrão.

Dos nove garanhões, três foram considerados “maus refrigeradores”, com uma quebra $\geq 40\%$ de motilidade após 24h de refrigeração. Na Tabela 6 são apresentados os valores percentuais das motilidades obtidas para estes garanhões, sendo visível uma melhoria numérica da motilidade nas amostras tratadas, dentro de cada tempo. É também de notar que a diferença de motilidade entre tempos para cada

processamento tem, na generalidade, uma variação superior, principalmente às 24h, na amostra controlo relativamente à amostra SLC.

Tabela 6: Valores percentuais das motilidades dos ejaculados de garanhões “maus refrigeradores” às 0, 24, 48 e 72h para cada um dos processamentos de sémen realizados (n=3).

Garanhão		Tempo		ISAS®				Motilidade Subjetiva (%)	
				Motilidade progressiva (%)		Motilidade Total (%)			
				C	SLC	C	SLC	C	SLC
2	0h	48,9	68,2	67,9	79	70	70		
	24h	7,7	59,6	25,2	68,1	10	70		
	48h	3,9	46,3	10,3	56,3	5	50		
	72h	4,7	32,4	14,5	43,3	5	40		
3	0h	15,6	23,4	33,8	46,3	35	35		
	24h	4,9	16	11,4	28,6	10	25		
	48h	3,7	16,5	10	22,8	5	15		
	72h	3,1	10,8	6,3	16,4	5	15		
9	0h	36,6	58,7	64,3	85,1	65	70		
	24h	13,9	25,5	34	45,5	30	45		
	48h	11,7	25,6	32,2	54,1	25	45		
	72h	9,3	11,8	23,8	27,8	15	30		

C - refrigeração controlo; SLC - centrifugação com monocamada de Androcoll-E®.

Relativamente aos parâmetros de morfologia, não se encontraram diferenças significativas entre tratamentos às 72h, nem entre a percentagem de SPZ morfológicamente normais e entre cada parâmetro, nem individualmente (Tabela 7). No entanto é de realçar que as anomalias do flagelo (TI e cauda), que consiste na estrutura propulsora da célula espermática, apresentam uma diminuição numérica nas amostras tratadas.

Tabela 7: Valores percentuais médios $\pm\sigma$ * de espermatozoides morfologicamente normais e de anomalias de cabeça, trato intermédio (TI) e cauda às 72h (n=8).

Morfologia	C (%)	SLC (%)
Normais	67,6 \pm 12,6	78,6 \pm 8,7
Anomalias de cabeça	5,8 \pm 2,9	6,4 \pm 3,6
Anomalias de TI	16,2 \pm 10,5	8,5 \pm 4,6
Anomalias de cauda	10,4 \pm 6,9	6,5 \pm 3,8

*Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre médias.

C - refrigeração controlo; SLC - centrifugação com monocamada de Androcoll-E®, σ – desvio padrão.

3.4. Discussão e conclusão

Um aumento significativo da qualidade do sémen tratado por centrifugação com monocamada de coloide de sílica Androcoll-E® e refrigerado a 5°C em relação a amostras não centrifugadas, tem sido reportado em estudos anteriores com grande número de ejaculados (n>250), observando-se melhorias significativas nos parâmetros de motilidade e morfologia espermática (Morrell, 2010a). O objetivo deste trabalho experimental foi estudar as alterações de cinética e de morfologia espermática durante 72h de refrigeração entre as amostras não tratadas (C) e tratadas com Androcoll-E® (SLC). Nos resultados apresentados (Tabela 5) é notória uma deterioração das características cinéticas dos espermatozoides ao longo do tempo de conservação, como seria de esperar, sendo que esta deterioração é numericamente mais acentuada na amostra controlo. Apesar disso, e contrariamente ao previamente publicado (Johannisson *et al.*, 2009), as diferenças por nós encontradas não apresentam significado estatístico, exceto às 24h para VCL e VSL. De referir que a importância da motilidade dos espermatozoides e dos diferentes parâmetros de cinética espermática para a real capacidade fertilizante dos ejaculados é ainda um tema em debate. No entanto, a VCL e a VSL são dos parâmetros geralmente considerados com maior valor preditivo na fertilidade do sémen. Apesar da ausência de diferenças estatisticamente

significativas entre o sémen controlo e o sémen tratado, observa-se no entanto uma consistente superioridade numérica dos valores de motilidade obtidos com ejaculados SLC. A falta de significância poderá estar relacionada com o facto de a amostra ser reduzida, associada à elevada variabilidade existente entre ganhanhões no que diz respeito às características espermáticas.

Segundo Morrell (2010a), a maioria dos SPZ com anomalias não passam tão facilmente através do coloide como os SPZ morfológicamente normais. Neste trabalho houve uma diminuição numérica de quase 50% nos defeitos do TI das amostras tratadas, bem como uma redução no número de anomalias da cauda (Tabela 6).

A técnica de SLC é um recurso particularmente apelativo para aplicação em ganhanhões “maus refrigeradores”, pois apesar do custo associado à técnica, a melhoria na longevidade do sémen pode trazer benefícios em termos de fertilidade (Morrell, 2011). Morrell *et al.* (2011b), num estudo realizado em cinco ganhanhões com ejaculados “problema”, obteve uma melhoria na taxa de fertilidade pela recuperação de espermatozoides de boa qualidade suficientes para IA após SLC com Androcoll-E®. De forma semelhante e segundo Hoogewijs *et al.* (2011), a seleção de SPZ utilizando Androcoll-E® previamente à criopreservação de sémen resultou num aumento da motilidade progressiva dos SPZ pós-descongelção, sendo o seu benefício mais marcado em cavalos que produzem sémen inadequado para congelação. Ainda não existem estudos que diferenciem os efeitos desta técnica em ganhanhões “bons” e “maus refrigeradores”, mas é possível que o comportamento seja semelhante ao descrito por Hoogewijs *et al.* (2011) em relação à criopreservação de sémen. Analisando os dados recolhidos neste estudo individualmente, podemos considerar “maus refrigeradores” – quebra maior ou igual a 40% de motilidade progressiva às 24 h – apenas três dos nove ganhanhões utilizados. Analisando individualmente os resultados das motilidades obtidos para estes animais (Tabela 5), verifica-se a existência de uma motilidade numericamente mais elevada nas amostras processadas com SLC, relativamente a estes parâmetros cinéticos. Estes resultados são concordantes com os publicados por Morrell *et al.* (2011b), pelo que poder-se-ia

especular que num estudo com maior número de garanhões “maus refrigeradores” os benefícios do tratamento SLC poderiam ser mais evidentes. Assim, de uma forma geral, a discrepância dos resultados obtidos relativamente aos previamente publicados (Johannisson *et al.*, 2009; Morrell 2010a), poderá ser explicada pela pequena amostra utilizada no nosso estudo, aliada à sua heterogeneidade e pequeno número de “maus refrigeradores”.

Este trabalho foi desenvolvido durante a atividade primordialmente comercial do CRAV, pelo que os dados obtidos estiveram dependentes do número de animais levados ao centro, e dentro desses, apenas entraram no estudo os que se considerou (baseado em critérios de seleção da direção do centro e não nas necessidades da estagiária) apropriados para submeter ao tratamento por Androcoll-E®. Este facto resultou num número reduzido de amostras, pelo que os resultados aqui expressos devem ser considerados apenas indicativos, sendo de interesse acumular mais dados nas próximas épocas reprodutivas a fim de se obter conclusões mais consistentes.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo não demonstram uma superioridade qualitativa significativa das amostras de sémen refrigerado após tratamento com a técnica de centrifugação com monocamada de Androcoll-E® em sémen de garanhão. Dada a exiguidade da amostra no presente estudo, seria de interesse aumentar a amostragem e diferenciar “bons refrigeradores” de “maus refrigeradores”, para desta forma se poder obter conclusões mais sólidas sobre a possível utilidade desta técnica na indústria de inseminação artificial de equinos.

IV. Conclusões Gerais

A utilização de sémen refrigerado de garanhão para IA tem sofrido, nos últimos anos, um incremento notório, mas associada a esta técnica tem sido verificada uma redução nas taxas de fertilidade após IA, quando o armazenamento do sémen ultrapassa as 24h. Para este facto contribui a alta variabilidade da fertilidade individual dos garanhões e a baixa qualidade do sémen, como também a utilização de técnicas de colheita e processamento incorretas, comprometendo assim a sua qualidade durante a refrigeração (Neild *et al.*, 2005; Aurich & Aurich, 2006; Aurich, 2008; Morrell *et al.*, 2010a).

Os motivos supracitados predispoem sinergicamente a investigação de novas metodologias de melhoramento de sémen, nomeadamente o método de seleção de espermatozoides através de SLC com Androcoll-E® (Fig. 26). Esta técnica tem demonstrado uma superioridade do sémen após refrigeração e armazenamento, não só a nível de qualidade e longevidade, como também a nível de fertilidade, relativamente ao sémen processado



Fig. 26: Primeiro poldro nascido no CRAV após IA de égua com 22 anos e útero de grau III, através da utilização de sémen refrigerado no qual foi aplicada a técnica de centrifugação com monocamada de Androcoll-E® (24 de maio de 2012).

sem recurso a SLC (Morrell *et al.*, 2010a; Morrell *et al.*, 2011b). Contudo, os resultados estatísticos obtidos no trabalho experimental apresentado nesta dissertação não foram concordantes com a maioria dos estudos realizados previamente.

Assim, e pelo custo económico elevado associado à utilização deste tipo de técnicas, deve investir-se em estudos que distingam claramente os resultados entre garanhões

“bons” e “maus refrigeradores”, de forma a permitir direccionar a sua utilização ao tipo de reprodutor.

Bibliografia

Ahmad Z, Anzar M, Shahab M, Ahmad N & Andrabi S M H (2003) Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology*, **59**: 1189-1202.

Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S & Hinsch E (2003) *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, **60**: 269-279.

Allen W R & Wilsher S (2012) The influence of mare numbers, ejaculation frequency and month on the fertility of Thoroughbred stallions. *Equine Veterinary Journal*, **44**: 535-541.

Anónimo (s.d.) *Disposable semen collection components*. Livestock Concepts, <http://livestockconcepts.com/en/ai-breeding-supplies/2568-disposable-semen-collection-components.html>, acedido a 12/02/2013.

Anónimo (2011) *Semen examination*. HSB-Blendivet® UG, <http://www.hsb-blendivet.de/SamenuntersuchungE.html>, acedido a 12/02/2013.

Aurich C (2005) Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **89**: 65–75.

Aurich C (2008) Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, **107**: 268-275.

Aurich C (2011) Semen Extenders for Cooled Semen (Europe). In *Equine Reproduction* (2nd ed., Vol. 1), McKinnon A O, Squires E L, Vaala W E & Varner D D (eds), Wiley-Blackwell, 1336-1340.

Aurich C & Spengler J (2007) Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **67**: 912-918.

Aurich J & Aurich C (2006) Developments in European Horse Breeding and Consequences for Veterinarians in Equine Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**: 275-279.

Aurich J, Schönherr U, Hoppe H & Aurich C (1997) Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, **48**: 185-192.

Ball B A, Baumber J & Sabeur K (2002) Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **58**: 299-300.

Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E & Magistrini M (1998) Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. *Theriogenology*, **50**: 229-236.

Batellier F, Magistrini M, Fauquant J & Palmer E (1997) Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **48**: 397-410.

Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J M & Magistrini M (2001) Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, **68**: 181-190.

Bedford-Guaus S J (2007) Transported Stallion Semen and Breeding Mares with Cooled or Frozen-Thawed Semen. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **6**: 239-248.

Bliss S B, Voge J L, Hayden S S, Teague S R, Brinsko S P, Love C C, Blanchard T L & Varner D D (2012) The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, **77**: 1232-1239.

Bradecamp E A (2011) How to Process High- and Low-Quality Semen for Cooling and Shipment. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, **57**: 19-23. San Antonio, Texas, USA.

Brandon C L, Heusner G L, Caudle A B & Fayrer-Hosken R A (1999) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, **52**: 863-873.

Brinsko S P (2011) Semen Extenders for Cooled Semen (North America). In *Equine Reproduction* (2nd ed., Vol. 1). McKinnon A O, Squires E L, Vaala W E & Varner D D (eds), Wiley-Blackwell, 1341-1343.

Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (2011a) Examination of the Stallion for Breeding Soundness. In *Manual of Equine Reproduction* (3rd ed.). Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (eds), Mosbi Elsevier, 177-206.

Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (2011b) Reproductive Anatomy of the Mare. In *Manual of Equine Reproduction* (3rd ed.). Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (eds), Mosbi Elsevier, 1-9.

Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (2011c) Semen Collection and Artificial Insemination with Fresh Semen. In *Manual of Equine Reproduction* (3rd ed.). Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (eds), Mosbi Elsevier, 160-175.

Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (2011d) Semen Preservation. In *Manual of Equine Reproduction* (3rd ed.). Brinsko S P, Blanchard T L, Varner D D, Schumacher J, Love C C, Hinrichs K & Hartman D (eds), Mosbi Elsevier, 207-227.

Brinsko S P, Crockett E C & Squires E L (2000a) Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, **54**: 129-136.

Brinsko S P, Rowan K R, Varner D D & Blanchard T L (2000b) Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **53**: 1641-1655.

Brinsko S P, Varner D D, Love C C, Blanchard T L, Day B C & Wilson M E (2005) Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*, **63**: 1519–1527.

Bruemmert J E, Coy R C, Squires E L & Graham J K (2002) Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *Journal of Animal Science*, **80**: 12-18.

Bussalleu E, Pinart E, Rivera M M, Arias X, Briz M, Sancho S, García-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Yeste M, Casas I, Rigau T, Rodriguez-Gil J E & Bonet S (2008) Effects of Filtration of Semen Doses from Subfertile Boars through Neuter Sephadex Columns. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 48-52.

Caballero I, Vazquez J M, García E M, Parrilla I, Roca J, Calvete J J, Sanz L & Martínez E A (2008) Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, **70**: 1352–1355.

Carver D A & Ball B A (2002) Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, **58**: 1587-1595.

Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D & Carluccio A (2011) Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, **75**: 1319–1326.

Costa A L, Martins-Bessa A, Andrade A R, Guimarães T, Rebordão M R, Gamboa S, Bravo P P, Correia M J, Colaço J, Galvão I, Rocha A (2012) Single Layer Centrifugation with Androcoll-E™ improved progressive motility and percentage of live spermatozoa with intact acrosome of chilled stallion semen but did not have an effect on DNA integrity. *Open Journal of Animal Sciences*, **2**: 159-165.

Crabtree J (2010) Prebreeding examination of the stallion 2. Semen collection and evaluation. *In Practice*, **32**: 58-63.

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H & Gagnon C (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, **2**: 48-54.

Deichsel K, Palm F, Koblishke P, Budik S & Aurich C (2008) Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, **69**: 940–945.

Douglas-Hamilton D H, Osol R, Osol G, Driscoll D & Noble H (1984) A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, **22**: 291-304.

Duoos L, Troedsson M H T, Alghamdi A S, Miller L & Roberts K P (2002) The importance of osmotic pressure for the quality of fresh, cooled, and cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, **58**: 261-264.

Francl A T, Amann R P, Squires E L & Pickett B W (1987) Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. *Theriogenology*, **27**: 517-525.

Giesecke K, Sieme H & Distl O (2010) Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: A review. *The Veterinary Journal*, **185**: 265-271.

Graham J K (2001) Assessment of Sperm Quality. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, **47**: 302-305. San Diego, California, USA.

Hallap T, Håård M, Jaakma Ü, Larsson B & Rodriguez-Martinez H (2004) Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility?. *Theriogenology*, **62**: 702-713.

Henkel R R & Schill W-B (2003) Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **1**: 1-22.

Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, De Schauwer C, De Kruif A & De Vliegher S (2011) Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, **43**: 35-41.

Ibrahim N M, Foster D N & Crabo B G (2001) Localization of Clusterin on Freeze-Preserved Bull Spermatozoa Before and After Glass Wool-Sephadex Filtration. *Journal of Andrology*, **22**: 891-902.

Januskauskas A, Lukoseviciute K, Nagy S, Johannisson A & Rodriguez-Martinez H (2005) Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology*, **63**: 160-178.

Jasko D J, Hathaway J A, Schaltenbrand V L, Simper W D & Squires E L (1992) Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **37**: 1241–1252.

Jasko D J, Moran D M, Farlin M E & Squires E L (1991) Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, **35**: 1059–1067.

Johannisson A, Morrell J M, Thorén J, Jönsson M, Dalin A -M & Rodriguez-Martinez H (2009) Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, **116**: 119-128.

Jones R & Mann T (1973) Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London*, **184**: 103-107. London.

Kankofer M, Kolm G, Aurich J & Aurich C (2005) Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, **63**: 1354-1365.

Kareskoski M & Katila T (2008) Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, **107**: 249–256.

Katila T (1997) Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*, **48**: 1217-1227.

Katila T (2011) Containers for Transport of Equine Semen. In *Equine Reproduction* (2nd ed., Vol. 1), McKinnon A O, Squires E L, Vaala W E & Varner D D (eds), Wiley-Blackwell, 1330-1335.

Katila T, Combes G B, Varner D D & Blanchard T L (1997) Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*, **48**: 1085-1092.

Katila T, Kareskoski A M, Venhoranta H & Virtala A -M (2010) The proportion of seminal plasma in transported insemination doses and the outcome of inseminations with transported stallion semen. *10th International Symposium on Equine Reproduction*, **26**. Lexington, K Y, USA.

Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL & Morse GW (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, **21**: 327-336.

Len J A, Jenkins J A, Eilts B E, Paccamonti D L, Lyle S K & Hosgood G (2010) Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. *Theriogenology*, **73**: 225-231.

Limone L E, Shaughnessy D W, Gómez-Ibáñez S, McDonnell S M & Bedford S J (2002) The effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm motion measures and semen pH during cooled storage. *Theriogenology*, **58**: 333-336.

Lindahl J, Dalin A -M, Stuhmann G & Morrell J M (2012) Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6°C prior to artificial insemination. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **54**: 40.

Loomis P R (2006) Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **22**: 663-676.

Loomis P R (2011a) Processing Semen for Cooled Transport. *Proceedings of the 17th Congress of the Italian Association of Equine Veterinarians*, 23-26. Montesilvano, Italy.

Loomis P R (2011b) Semen Processing Techniques for Management of Subfertile Stallions. *Proceedings of the 17th Congress of the Italian Association of Equine Veterinarians*, 18-22. Montesilvano, Italy.

Loomis P R (2012) Biosecurity and quality assurance in equine semen production centers. *Proceedings of the 8th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology*, 115-123. Vancouver, Canada.

Loomis P R (s.d.) *Cooled and Frozen Semen Technology*. WBFSH, <http://www.wbfs.org/files/Paul%20Loomis%20-%20semen.pdf>, accessed a 03/02/2013.

Love C C, Brinkerhoff J M, Thompson J A, Blodgett G, Teague S R, Blanchard T L & Varner D D (2011) Relationship Between Breeding Method and the Fertility of Cooled-Shipped Stallion Sperm. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, **57**: 229-230. San Antonio, Texas, USA.

Macpherson M L, Shore M D, Fernandez M H, Miller C D, Thompson J A, Blanchard T L & Varner D D (2001) Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. *Proceedings Havemeyer Foundation Workshop From Epididymis to Embryo*, **6**: 27-29. New Orleans, USA.

Macpherson M, Blanchard T L, Love C C, Brinsko S P & Varner D D (2002) Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology*, **58**: 317-320.

Magistrini M, Chanteloube P & Palmer E (1987) Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, **35**: 127-133.

Magistrini M, Couty I & Palmer E (1992) Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl.*, **88**: 97-110.

McDonnell S M (1992) Ejaculation - Physiology and Dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **8**: 57-70.

Moran D M, Jasko D J, Squires E L & Amann R P (1992) Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **38**: 999-1012.

Morrell J M (2006) Update on Semen Technologies for Animal Breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**: 63-67.

Morrell J M (2011) Biomimetics in Action: Practical Applications of Single Layer Centrifugation for equine breeding. *Journal of Veterinary Science & Technology*, **2**: 2.

Morrell J M & Rodriguez-Martinez H (2009) Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. *The Open Andrology Journal*, **1**: 1-9.

Morrell J M & Rodriguez-Martinez H (2011) Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*.

Morrell J M, Dalin A -M & Rodriguez-Martinez H (2008) Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Animal Reproduction*, **5**: 121-126.

Morrell J M, Dalin A -M & Rodriguez-Martinez H (2009a) Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: Yield, motility and survival. *Equine Veterinary Journal*, **41**: 53-58.

Morrell J M, Garcia M B, Pena F J & Johannisson A (2011a) Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation. *Theriogenology*, **76**: 1424-1432.

Morrell J M, Johannisson A, Dalin A -M & Rodriguez-Martinez H (2009b) Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*, **72**: 879-884.

Morrell J M, Mari G, Kútvölgyi G, Meurling S, Mislei B, Iacono E & Rodriguez-Martinez H (2011b) Pregnancies Following Artificial Insemination with Spermatozoa from Problem Stallion Ejaculates Processed by Single Layer Centrifugation with Androcoll-E. *Reproduction in Domestic Animals*, **46**: 642-645.

Morrell J M, Persson B, Tjellström H, Laessker A, Nilsson H, Danilova M & Holmes P V (2005) Effect of Semen Extender and Density Gradient Centrifugation on the Motility and Fertility of Turkey Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, **40**: 522-525.

Morrell J M, Rodriguez-Martinez H & Johannisson A (2010a) Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Veterinary Journal*, **42**: 579-585.

Morrell J M, Rodriguez-Martinez H & Johannisson A (2010b) Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *Reproductive BioMedicine Online*, **21**: 429-436.

Mortimer D (2000) Sperm preparation methods. *Journal of Andrology*, **21**: 357–366.

Munuce M J, Serravalle A, Caille A M, Zumoffen C, Botti G, Cabada M & Ghersevich S (2009) Human tubal secretion can modify the affinity of human spermatozoa for the zona pellucida. *Fertility and Sterility*, **91**: 407-413.

Neild D N, Gadella B M, Agüero A, Stout T A & Colenbrander B (2005) Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **89**: 47-56.

Neto C R, Monteiro G A, Soares R F, Pedrazzi C, Dell’aqua Jr J A, Papa F O & Alvarenga M A (2013) Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, **33**: 40-43.

Nunes D B, Zorzatto J R, Costa e Silva E V & Zúccari C E S N (2008) Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Animal Reproduction Science*, **104**: 434-439.

Padilla A W & Foote R H (1991) Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *Journal of Animal Science*, **69**: 3308-3313.

Pagl R, Aurich J E, Müller-Schlösser F, Kankofer M & Aurich C (2006) Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*, **66**: 1115-1122.

Parrish J J, Krogenaes A & Susko-Parrish J L (1995) Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, **44**: 859-869.

Pickett B W, Sullivan J J & Seidel Jr G E (1975) Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *Journal of Animal Science*, **40**: 917-923.

Price S, Aurich J, Davies-Morel M & Aurich C (2008) Effects of Oxygen Exposure and Gentamicin on Stallion Semen Stored at 5 and 15°C. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 261-266.

Province C A, Squires E L, Pickett B W & Amann R P (1985) Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, **23**: 925-934.

Rigby S L, Brinsko S P, Cochran M, Blanchard T L, Love C C & Varner D D (2001) Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science*, **68**: 171-180.

Samper J C, Pycock J F & Estrada A (2004) Evaluation of the stallion for artificial insemination with cooled shipped semen. *Equine Veterinary Education*, **16**: 144-149.

Shamsuddin M & Rodriguez-Martinez H (1994) A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Animal Reproduction Science*, **36**: 61-75.

Sheerin P C (2007) Preparing cooled semen for shipment. *Proceedings of the NAVC Congress*, 181-182. Orlando, Florida.

Shepherd C (2008) 'How to' Collect a semen sample. *Proceedings of the 47th British Equine Veterinary Association Congress*, 85. Liverpool, United Kingdom.

Sieme H, Echte A & Klug E (2002) Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. *Theriogenology*, **58**: 313-316.

Sieme H, Katila T & Klug E (2004) Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*, **61**: 769-784.

Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R & Klug E (2003) Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, **38**: 134-140.

Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp A B, Iváncsics J, Baranyai B, Baranyai B, Gócza E, Kovács A (2002) Effect of Swim up and Percoll Treatment on Viability and Acrosome Integrity of Frozen-thawed Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, **37**: 285-290.

StatSoft Inc. (2011) STATISTICA (Data Analysis Software System), version 10. www.statsoft.com.

Suarez S S (2007) Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*, **19**: 103-110.

Tibary A (2007) Stallion reproductive behavior. In *Current therapy in equine reproduction*, Samper J C, Pycock J F & McKinnon A O (eds), Saunders Elsevier, St. Louis, USA, 174-184.

Troedsson M H (1999) Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, **52**: 461-471.

Troedsson M H T, Loset K, Alghamdi A M, Dahms B & Crabo B G (2001) Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, **68**: 273-278.

Varner D D, Blanchard T L, Love C L, Garcia M C & Kenney R M (1988) Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, **29**: 1043-1054.

Varner D D, Blanchard T L, Meyers P J & Meyers S A (1989) Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology*, **32**: 515-525.

Varner D D, Love C C, Blanchard T L, Hartman DL, Bliss S B, Hayden S S, Voge J, Carroll B S, Eslick M C & Macpherson M L (2010) Breeding-Management Strategies and Semen-Handling Techniques for Stallions — Case Scenarios. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, **56**: 215-226. Baltimore, MD, USA.

Varner D D, Scanlan C M, Thompson J A, Brumbaugh G W, Blanchard T L, Carlton C M & Johnson L (1998) Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, **50**: 559-573.

Waite J A, Love C C, Brinsko S P, Teague S R, Salazar Jr J L, Mancill S S & Varner D D (2008) Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, **70**: 704-714.

Anexos

Anexo 1: Casuística geral das atividades desenvolvidas no CRAV do ICBAS-UP durante o estágio curricular

Durante o estágio curricular desenvolvido no CRAV (ICBAS-UP) foram acompanhadas um total de 62 éguas, sendo 47 pertencentes a clientes, das quais 33 são PSL (Gráficos 1 e 2).

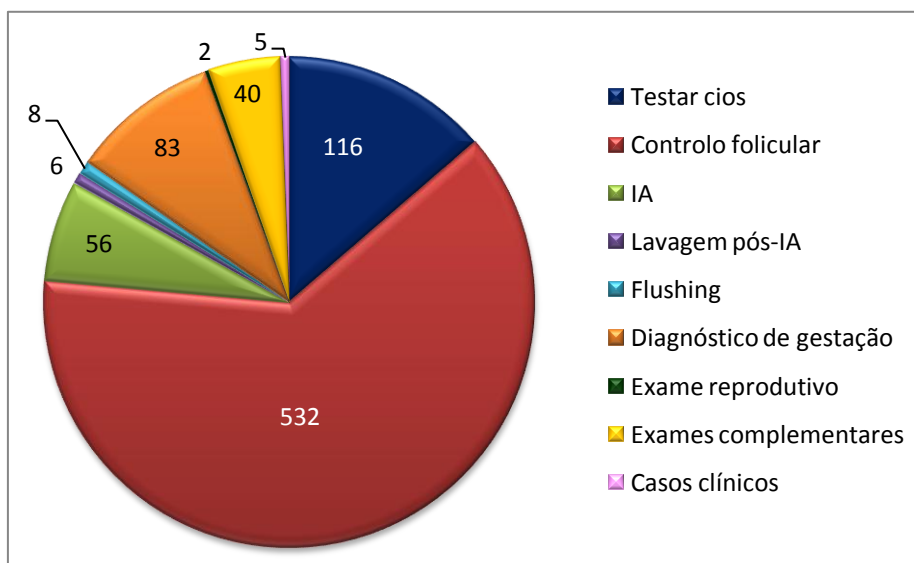


Gráfico 1: Valores numéricos referentes à casuística de clínica reprodutiva da égua (n=62 éguas; IA: inseminação artificial).

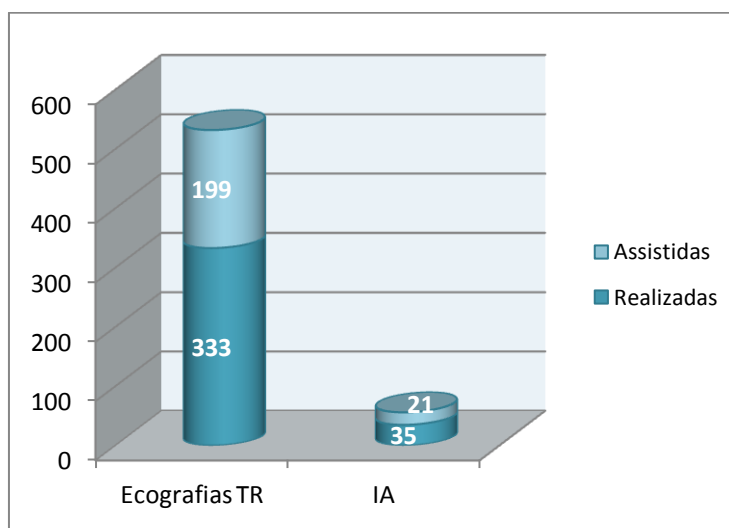


Gráfico 2: Valores numéricos referentes à casuística de inseminação artificial (IA; n=56) e ecografias transretais (TR; n=532), diferenciando o número de procedimentos realizados e assistidos.

Foram também acompanhados uma totalidade de 13 garanhões, dos quais 11 pertenciam a clientes. A raça mais prevalente foi o PSL, constituindo oito dos 13 garanhões (Gráficos 3, 4 e 5).

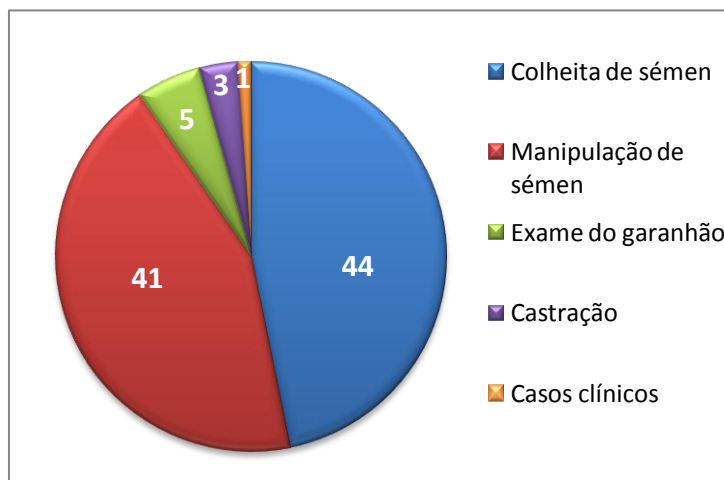


Gráfico 3: Valores numéricos referentes à casuística de clínica reprodutiva do garanhão (n=13 garanhões).

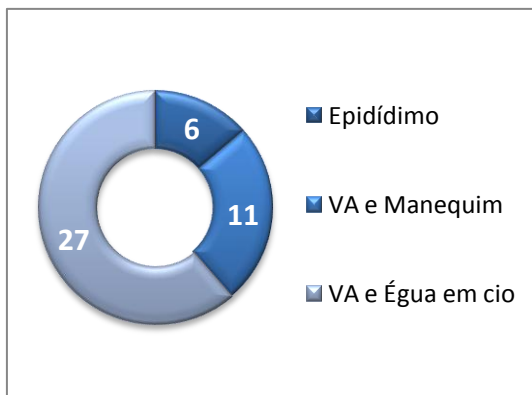


Gráfico 4: Valores numéricos referentes à casuística detalhada relativa à colheita de sémen no garanhão (n=44; VA: vagina artificial).

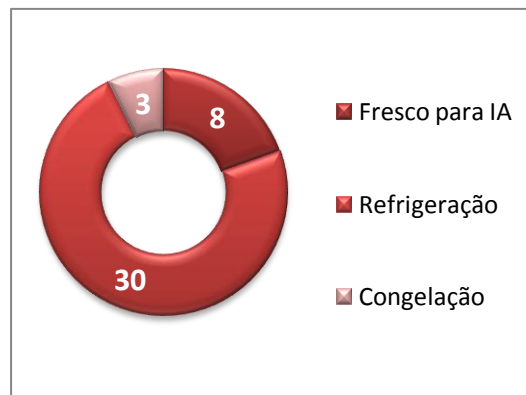


Gráfico 5: Valores numéricos referentes à casuística detalhada relativa à manipulação de sémen (n=41; IA: inseminação artificial).

Anexo 2: Protocolo para preparação de sémen equino utilizando Androcoll-E®-Large (CRAV, ICBAS-UP)

1. Equilibrar o coloide à temperatura ambiente antes da sua utilização.
2. Verificar a concentração do sémen.
3. Diluir o ejaculado a 100×10^6 SPZ/mL com diluidor de *Kenney* ou equivalente, aquecido a 37°C.
4. Colocar assepticamente 15 mL de coloide num tubo cónico de centrífuga de 50 mL.
5. Adicionar cuidadosamente uma camada de 15-18 mL de sémen diluído no topo do coloide utilizando uma pipeta *Pasteur* para os primeiros três mililitros, e em seguida uma pipeta descartável para os restantes 12-15 mL. Deve haver uma interface bem definida entre o coloide e o sémen.
6. Centrifugar a 500 g durante 20 min.
7. Remover cuidadosamente o sobrenadante e a maioria do coloide sem perturbar o *pellet* de espermatozoides, deixando 1-2 mL de coloide sobre o mesmo.
8. Com uma pipeta *Pasteur* limpa, aspirar o *pellet* e transferi-lo para um tubo ao qual se adiciona o diluidor de forma a obter uma concentração de $25-50 \times 10^6$ SPZ/mL

Nota: Embora o coloide seja estéril, este não contém antibióticos. Por este motivo, devem ser sempre utilizadas técnicas assépticas quando forem removidas amostras do recipiente original.